Beitrag zur Kenntnis der Biogenese der Spirostanole und Untersuchungen über die Biogenese der Homo-isoflavone

INAUGURAL–DISSERTATION

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen

Fakultät der Universität Basel

von

PAUL ANDERMATT

aus Merenschwand AG

Basel 1971

Beitrag zur Kenntnis der Biogenese der Spirostanole und Untersuchungen über die Biogenese der Homo-isoflavone

INAUGURAL–DISSERTATION

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen

Fakultät der Universität Basel

von

PAUL ANDERMATT

aus Merenschwand AG

Basel 1971

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren

Dr. Ch. Tamm
Dr. C.A. Grob

Basel, den 28. Juni 1971

Prof. Dr. H. P. Laubscher
Dekan

UNIV. LEIDEN BIBL.

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde in den Laboratorien des Instituts für Organische Chemie der Universität Basel unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ch. Tamm ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,
Herrn Professor Tamm, danke ich herzlich für das grosse Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat und für das angenehme Arbeitsverhältnis.

I. Teil: Beitrag zur Kenntnis der Biogenese der Spirostanole

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546026_0037

INHALTSVERZEICHNIS

I. Beitrag zur Kenntnis der Biogenese der Spirostanole

Seite

A. THEORETISCHER TEIL 1

I. Einleitung 1

1. Die Inhaltsstoffe der Species Dititalis 1

2. Biogenese der Cardenolide und Sapogenine 2

2.1. Uebersicht 2

2.2. Problemstellung 4

II. Biogenese der Steroidsapogenine 6

1. Isolierung der Sapogenine 6

1.1. Incorporationsversuche mit [^{14}C]-Cholesterol 6

1.2. Incorporationsversuche mit [^{14}C]-Cycloartenol 10

2. Chemischer Abbau von [^{14}C]-Tigogenin nach dem Einbau von [1,7,15,22,26-^{14}C]-Cholesterol 12

2.1. Allgemeines 12

2.2. Radioaktivitätsverteilung 15

3. Diskussion der Resultate 19

3.1. Biogenese 19

3.2. Stereochemie 20

3.3. Ausblick 23

Seite

B. EXPERIMENTELLER TEIL 25

1. Allgemeines 25

2. Isolierung der Sapogenine aus inaktivem Material 26

2.1. Isolierung der Saponine 26

2.2. Hydrolyse der Saponine 27

2.3. Isolierung von Tigogenin, Gitogenin und Digitogenin 28

3. Isolierung der Sapogenine nach Verabreichung von [1,7,15,22,26-^{14}C]-Cholesterol 28

4. Abbau von [^{14}C]-Tigogenin nach der Incorporation von [1,7,15,22,26-^{14}C]-Cholesterol 29

4.1. [^{14}C]-3-O-Acetyltigogenin 29

4.2. [^{14}C]-Pseudotigogenin 30

4.3. [^{14}C]-Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion und [^{14}C]-α-Methylglutarsäure 30

4.4. Natrium-[^{14}C]-acetat 32

4.5. Schmidt-Abbau des Natrium-[^{14}C]-acetats 32

C. ZUSAMMENFASSUNG 34

D. LITERATURVERZEICHNIS 36

A. THEORETISCHER TEIL

I. Einleitung

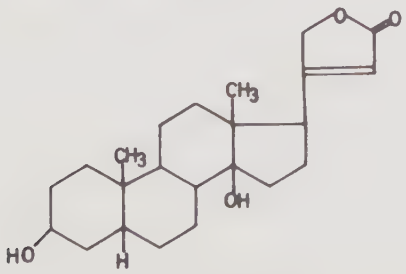
1. Die Inhaltsstoffe der Species Digitalis

Schon 1785 erkannte der schottische Arzt William Withering, dass Extrakte aus Blättern oder Samen von Digitalis-Pflanzen (Fingerhut) als Heilmittel in der Herztherapie wertvolle Dienste leisten [1].

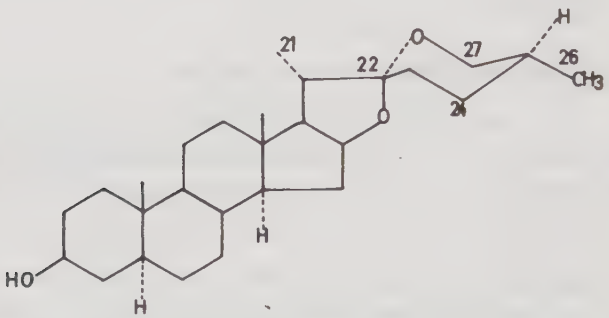
Digitalis-Arten, die bei uns häufig wild wachsen, werden ihrer medizinischen Bedeutung wegen heute auch in Kulturen angepflanzt. Ihre Blütenpracht wird ausserdem in Ziergärten geschätzt. Besonders verbreitet sind Digitalis purpurea (roter Fingerhut), Digitalis lanata (wolliger Fingerhut), Digitalis lutea, Digitalis grandiflora oder Digitalis mertonensis [2].

Nachdem die herzaktive Wirkung der Digitalispräparate schon früh bekannt war, setzte die chemische Untersuchung dieser Pflanzenart zu Beginn des letzten Jahrhunderts ein.

Die isolierten Steroide lassen sich in zwei Klassen einteilen, nämlich in die digitaloiden Glykoside ("Herzglykoside") und die Saponine [3]. Bei den "Herzglykosiden" handelt es sich um Glykoside von Cardenoliden, deren einfachster Vertreter das Digitoxigenin ist:



Die Saponine sind glykosidische Sterole, welche in Wasser schäumende, hämolytisch wirkende Lösungen bilden. Ihre Aglykone nennt man Sapogenine. Ein Beispiel ist das Tigogenin:



Wegen ihrer charakteristischen Spiroketalgruppierung bezeichnet man diese Verbindungen auch als Spirostanole.

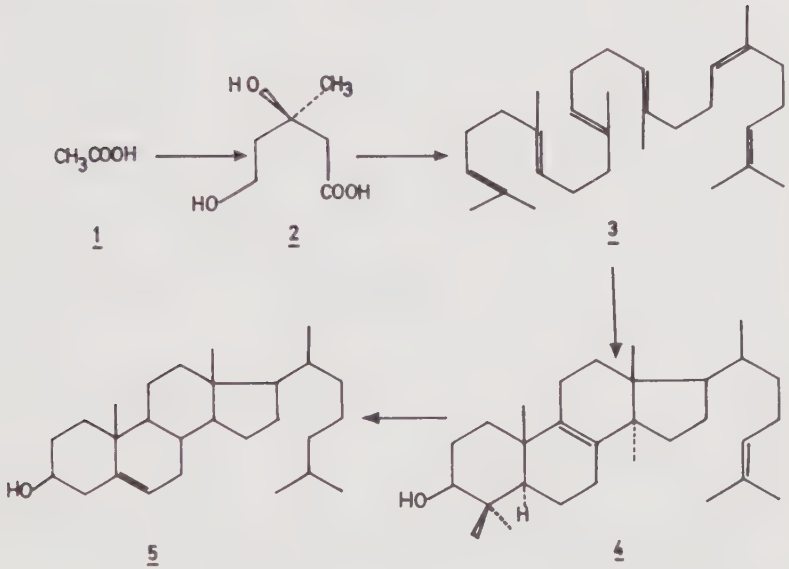
2. Biogenese der Cardenolide und Sapogenine

2.1. Uebersicht:

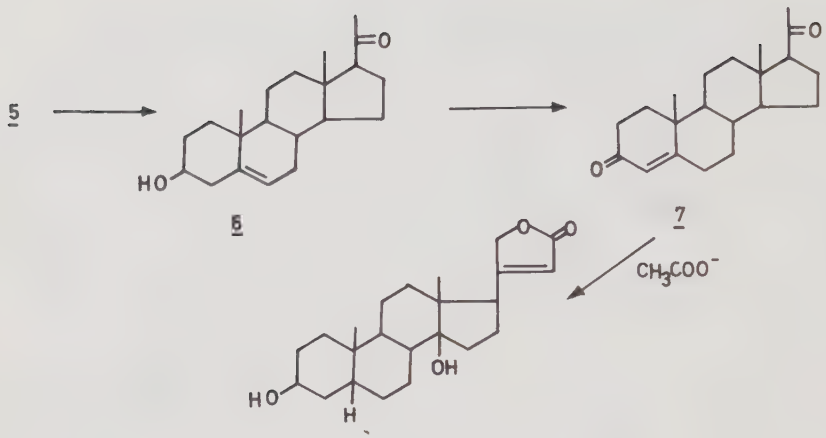
Man weiss, dass die Biosynthese dieser Steroidklassen analog zu derjenigen der Steroide des tierischen und menschlichen Organismus über folgende Stufen verläuft:

Essigsäure (1) → Mevalonsäure (2) → Squalen (3) → Lanosterol (4) → Cholesterol (5), oder ein ähnliches C_{27}-Steroid [4] [5] [6] [7]. Vgl. Formelschema 1.

Formelschema 1: Biogenese der Cardenolide



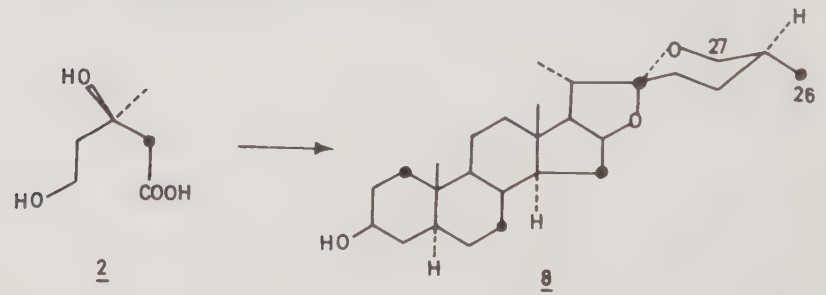
Bei der Bildung der Cardenolide wird Cholesterol (5) zunächst zu Δ^5-Pregnen-3-ol-20-on (6) abgebaut und dieses in Progesteron (7) umgewandelt. Kondensation von Progesteron (7) mit einem Mol Essigsäure ergibt den Butenolidring. Weitere Umwandlungen am tetracyclischen Ringsystem ergeben schliesslich die Cardenolide, z. B. Digitoxigenin:



2.2. Problemstellung:

Bei Digitalis lanata EHRH. wurde von verschiedenen Forschungsgruppen festgestellt, dass [^{14}C]-Acetat und [^{14}C]-Mevalonat am natürlichen Aufbau der Steroidsapogenine beteiligt sind [11] [12] [13].

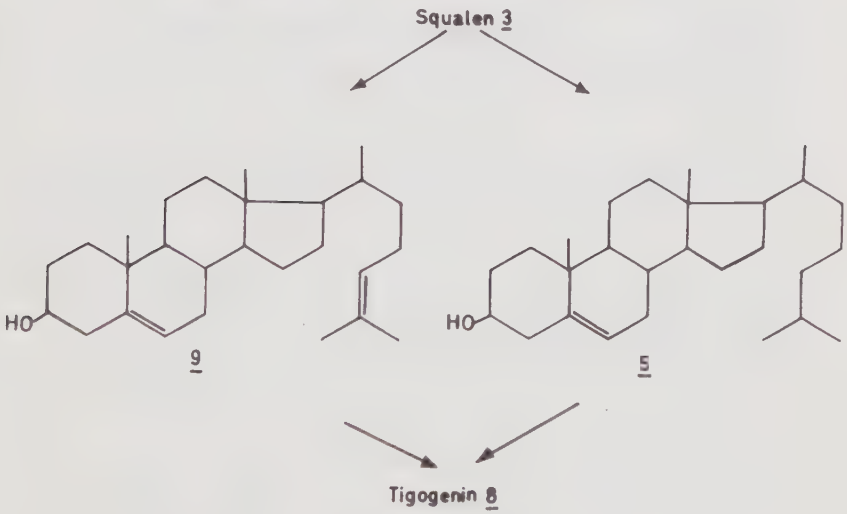
Joly und Tamm konnten zeigen, dass [2-^{14}C]-D,L-Mevalonat (2) sowohl im Steroidteil wie auch in der Spiroketalseitenkette von Tigogenin (8) eingebaut wird. Sie kamen zum Schluss, dass das C-Atom Nr. 2 der Mevalonsäure ausschliesslich in die 26-Methylgruppe übergeht:



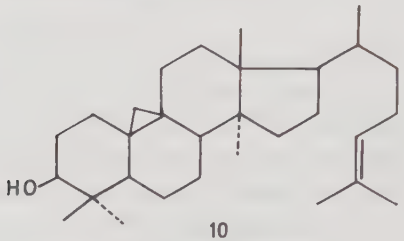
Diese Resultate beweisen, dass in Digitalis lanata die Spirostanole, im Gegensatz zu den Cardenoliden, aus dem C_{27}-Zwischenprodukt ohne Veränderung des Grundgerüsts aufgebaut werden.

Neben Cholesterol (5) wäre aber auch ein Δ^{24}-Derivat, z.B. Desmosterol (9) oder eine ähnliche C_{27}-Zwischenstufe denkbar [14] [15]. Ein Δ^{24}-Derivat würde eine selektive enzymatische Hydroxylierung des allylischen C-Atoms Nr. 27 erleichtern. Dieser würde dann eine stereospezifische, enzymatische Hydrierung folgen, welche zur endgültigen Spiroketalstruktur führt. Vgl. Formelschema 2.

Formelschema 2: Biogenese der Sapogenine



Zur Abklärung dieser Frage wurde radioaktiv markiertes Cholesterol (5) und Cycloartenol (10) jungen Digitalis lanata EHRH.-Pflanzen verabreicht.



10

Cycloartenol wurde verschiedentlich als Zwischenstufe beim Aufbau pflanzlicher Steroide, vor allem bei Phytosterolen, postuliert oder nachgewiesen [16] [17] [18] [19]. Cycloartenol weist am C-Atom Nr. 24 eine Doppelbindung auf; daher schien es als ^{24}-Sterol bei der Biosynthese der Sapogenine in Frage zu kommen.

Nach Verabreichung von [^{14}C]-Cholesterol sollten die radioaktiven Spirostanole Gitogenin, Digitogenin und Tigogenin isoliert werden und mit Hilfe eines gezielten chemischen Abbaus am Beispiel des Tigogenins die Verteilung der Radioaktivität bestimmt werden, um zu prüfen, ob [^{14}C]-Cholesterol ohne Veränderung in das Grundgerüst eingebaut worden ist. Im folgenden werden die Resultate dieser Untersuchungen dargelegt.

II. Biogenese der Steroidsapogenine

1. Isolierung der Sapogenine

1.1. Incorporationsversuche mit [^{14}C]-Cholesterol:

[1,7,15,22,26-^{14}C]-Cholesterol [1)] wurde nach der "Sprühmethode" [20] [21] auf die Blätter junger Pflanzen von Digita-

lis lanata EHRH [2] aufgetragen. $2{,}09 \cdot 10^7$ dpm (0,136 uC/mg) [^{14}C]-Cholesterol wurde in Aceton-Isopropanol-(10:1) gelöst und mittels einer Injektionsspritze auf die Blattoberfläche verteilt. Die "Dochtmethode" [6] konnte nicht verwendet werden, da Cholesterol in für Pflanzen geeigneten Lösungsmitteln unlöslich ist.

Nach einer Zeitspanne von 20 Tagen wurden die Blätter abgeschnitten. Um Reste von [^{14}C]-Cholesterol von der Blattoberfläche zu entfernen, wurden diese mit Petroläther gewaschen und anschliessend bei 50° getrocknet. Nach der von von Euw und Reichstein beschriebenen Extraktionsmethode [6] erhielt man aus 219,7 g getrockneten Blättern die in Tabelle 1 zusammengefassten Ausbeuten an Rohextrakten.

Die Blätter wurden fein gemahlen, zur Fermentierung über Nacht in Wasser gelegt und dann mehrmals mit 50 -70-proz. Alkohol heiss extrahiert. Die Extrakte wurden zur Entfernung von Gerbstoffen mit Blei (II)-hydroxid behandelt und die Filtrate im Vakuum eingeengt; die so erhaltene wässerige Lösung mit Petroläther, Chloroform, Chloroform-Alkohol-(3:2) ausgeschüttelt.

---

1) Wir danken Herrn Dr. U. Gloor, F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G., Basel, für dieses [^{14}C]-Cholesterolpräparat. Es wurde aus der Leber von Ratten isoliert, nachdem man den Tieren [2-^{14}C]-Natrium-mevalonat verabreicht hatte.

2) Hierzu dienten kultivierte Pflanzen eines ausgesuchten Stammes ("A-Pflanzen"), die vorwiegend Digitoxigeninglykoside und fast keine Digoxigeninglykoside produzieren. Sie wurden uns von der Versuchsgärtnerei Klushof der Firma Sandoz A.G., Basel, zur Verfügung gestellt, wofür wir dankbar sind.

Tabelle 1

Ausbeute an Rohextrakten aus 219,7 g getrockneten Blättern von Digitalis lanata EHRH. nach der Verabreichung von total $2{,}09 \cdot 10^7$ dpm (9,41 uC) [^{14}C]-Cholesterol 3).

Auszug	Menge in g	Radioaktivität in dpm pro mg	Radioaktivität in dpm total	Einbaurate in % 4)
Petroläther (Fette, Sterole)	1,182	5'200	$6{,}2 \cdot 10^6$	29,6
Chloroform (Cardenolide)	2,053	640	$1{,}3 \cdot 10^6$	6,1
Chloroform-Alkohol-(3:2) (Saponine)	6,087	46	$2{,}8 \cdot 10^6$	1,3

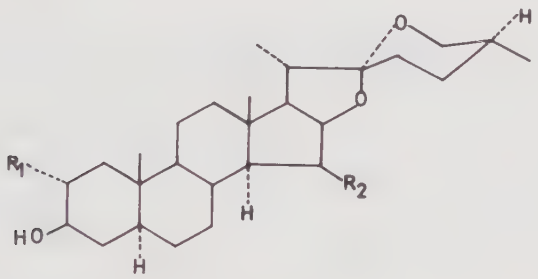
3) $1C = 222 \cdot 10^{10}$ dpm.

4) Einbaurate : $\frac{\text{Gesamtradioaktivität im Produkt} \cdot 100}{\text{Gesamtradioaktivität im "Precursor"}}$

Die Radioaktivitäten der unpolaren Extrakte sind relativ hoch. Wahrscheinlich enthalten sie grössere Mengen an unverändertem Cholesterol. Da Cholesterol als eine Vorstufe der Cardenolide angesehen wird [22] [23] [24], ist es möglich, dass diese Steroide ebenfalls radioaktiv markiert sind.

Der stärker polare Chloroform-Alkohol-Auszug wurde einer energischen sauren Hydrolyse [25] und einer alkalischen Nachhydrolyse unterworfen. Das dabei erhaltene rohe Sapogeningemisch wurde an Kieselgel (SiO_2) chromatographiert. Die isolierten Aglykone Tigogenin (8), Gitogenin und Digito-

genin wurden bis zum konstanten Schmelzpunkt und zur konstanten Radioaktivität umkristallisiert. Die Identifizierung der nach Dünnschichtchromatographie einheitlichen Sapogenine erfolgte durch direkten Vergleich mit authentischem Material.



R_1 = H, R_2 = H Tigogenin (8)

R_1 = OH, R_2 = H Gitogenin

R_1 = OH, R_2 = OH Digitogenin

Die Ausbeuten und Resultate der Radioaktivitätsbestimmungen sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2

Isolierung der Sapogenine aus 219,7 g getrockneten Blättern von Digitalis lanata EHRH. nach der Verabreichung von total $2,09 \cdot 10^7$ dpm (9,41 uC) [^{14}C]-Cholesterol.

Sapogenin	MG*)	Menge mg	Radioaktivität in dpm pro mg	total	pro mMol	Einbaurate %
Tigogenin	416	350	54	18900	22464	0,090
Gitogenin	432	21	73	1533	31536	0,007
Digitogenin	448	74	52	3848	23296	0,018

*) MG = Molekulargewicht

1.2. Incorporationsversuche mit [^{14}C]-Cycloartenol:

$3 \cdot 10^6$ dpm (1,35 uC) [28-^{14}C]-Cycloartenol (10) [5] wurden in Aethanol gelöst und nach der Sprühmethode [20] auf die Blätter von jungen Digitalis lanata EHRH.-Pflanzen aufgetragen.

Nach 14 Tagen wurden die Blätter abgeschnitten und nach der in Kap. 1.1. beschriebenen Methode aufgearbeitet. Aus 95 g trockenen Blättern erhielt man die in Tabelle 3 zusammengefassten Ausbeuten an Rohextrakten.

---

5) Das synthetische [28-^{14}C]-Cycloartenol-Präparat wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. G. Ourisson, Laboratoire associé au C.N.R.S., Institut de Chimie, Strasbourg, France, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3

Isolierte Rohextrakte aus 95 g getrockneten Blättern von Digitalis lanata EHRH. nach der Verabreichung von total $3 \cdot 10^6$ dpm (1,35 uC) [28-^{14}C]-Cycloartenol:

Auszug	Menge in g	Radioaktivität in dpm/mg
Petroläther (Fette, Sterole)	2,00	42
Chloroform (Cardenolide)	2,25	9
Chloroform-Alkohol-(3:2) (Saponine)	2,85	18

Der Chloroform-Alkohol-Extrakt wurde hydrolysiert und das resultierende, rohe Sapogeningemisch mittels Säulenchromatographie an Kieselgel aufgetrennt. Reines Tigogenin, welches dabei isoliert wurde, war völlig inaktiv.

Dies bedeutet, dass [28-^{14}C]-Cycloartenol nicht zur Bildung der Sterоidsapogenine verwendet worden ist. Ein ähnliches Resultat erhielten Tschesche et al. bei Einbauversuchen mit [^{14}C]-Desmosterol (7) [26].

Die Verunreinigung der Rohextrakte durch den "Precursor" verursachte geringe Radioaktivitäten.

2. Chemischer Abbau von [^{14}C]-Tigogenin nach dem Einbau von [1,7,15,22,26-^{14}C]-Cholesterol:

2.1. Allgemeines

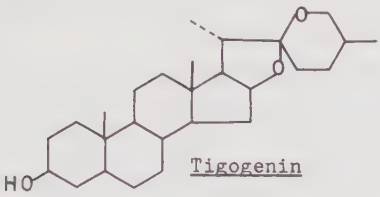
Anhand der bisherigen Versuche konnte gezeigt werden, dass Cholesterol eine Vorstufe der Steroidsapogenine darstellt. Ein ähnliches Resultat erhielt man mit Dioscorea spiculiflora [21]. Die Einbaurate war aber so gering, dass ein Abbau des Cholesterols und eine Resynthese - analog der Cardenolidbiogenese (vgl. Kap. I.2.1.) - nicht ausgeschlossen werden kann. Um diesen Befund und die Stereochemie an C-25 näher abzuklären, wurde mittels eines chemischen Abbaus die Radioaktivitätsverteilung im Spiroketalring bestimmt.

Abbau, Charakterisierung und Identifizierung des radioaktiven Materials setzt eine gründliche Kenntnis der einzelnen Reaktionsstufen voraus. Bevor ein Abbau mit radioaktivem Material in Angriff genommen werden kann, müssen die Abbaumethoden zuerst mit inaktiven Proben für die geringen Substanzmengen, welche bei den Versuchen mit radioaktiven Präparaten zu erwarten sind, durchgeführt werden. Auf diese Weise kann die Reinheit und die Bilanz der Radioaktivität garantiert werden.

Daher wurde zuerst inaktives Tigogenin nach den in Kap. 1.1. beschriebenen Methoden aus Digitalis lanata EHRH. isoliert. Die Identifizierung der Sapogenine und der Abbauprodukte erfolgte durch Elementaranalyse, Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt, Vergleich der Laufstrecken in den Dünnschichtchromatogrammen (R_f-Werte) und der IR.-Spektren mit authentischem Material.

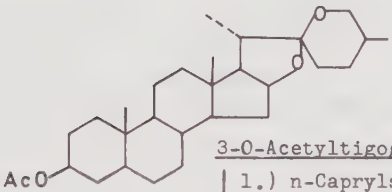
Der Abbau von inaktivem Tigogenin, der von Joly bereits weitgehend beschrieben wurde [14], ist in den Formelschemata 3 und 4 zusammengefasst. Er wird an dieser Stelle nicht nochmals ausführlich beschrieben.

Formelschema 3: Abbau von inaktivem Tigogenin



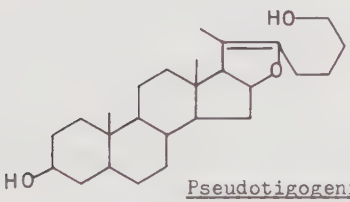
Tigogenin

Acetanhydrid



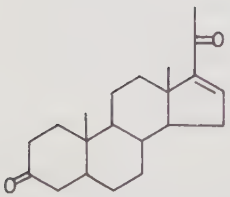
3-O-Acetyltigogenin

1.) n-Caprylsäure, 250°
2.) KOH-Methanol

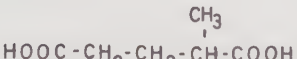


Pseudotigogenin

1.) CrO_3-Eisessig,
2.) $NaOH-H_2O$ - Methanol

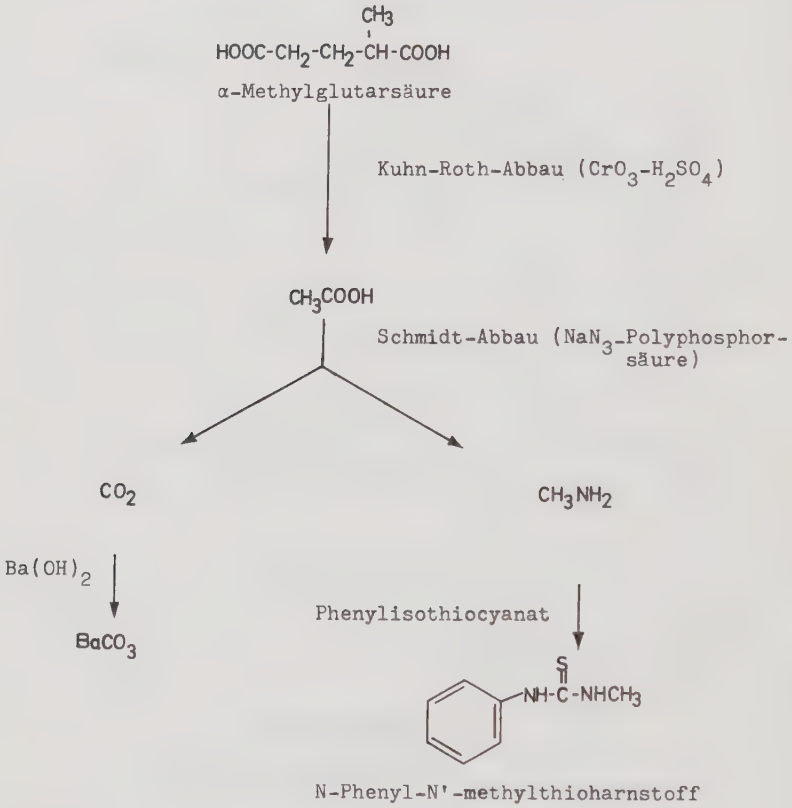


Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion



α-Methylglutarsäure

Formelschema 4: Abbau von α-Methylglutarsäure



2.2. Radioaktivitätsverteilung:

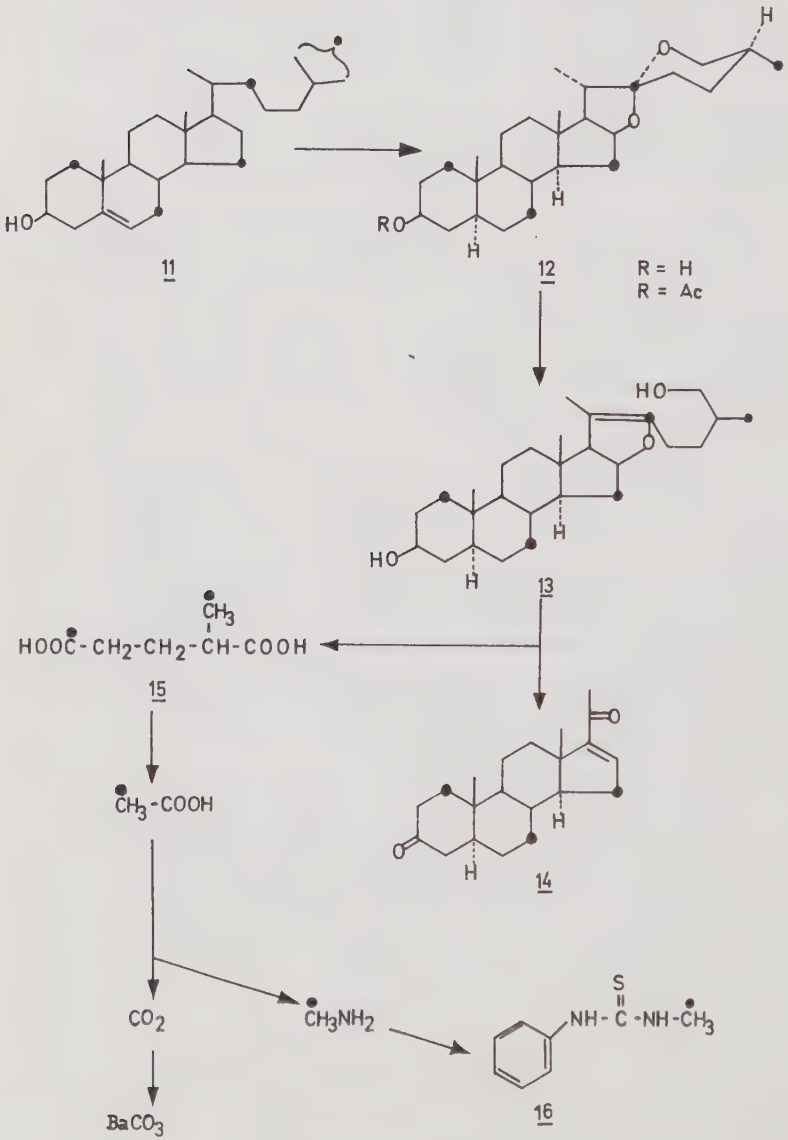
Wird [1,7,15,22,26-^{14}C]-Cholesterol (10) ohne Veränderungen im Grundgerüst in die Sapogenine eingebaut, so müssen bei Tigogenin die C-Atome Nr. 1,7,15,22 radioaktiv sein. (Vgl. Formelschema 6). Sind die C-Atome Nr. 26 und 27 in Cholesterol äquivalent, so tritt eine Verschmierung der restlichen Radioaktivität auf diese beiden C-Atome ein.

Die Resultate von Joly lassen erwarten, dass der Ringschluss zum Spiroketalsystem streng stereospezifisch erfolgt [14]. Dies lässt sich erklären durch die prochirale Konfiguration von C-25 (vgl. Kap. 3.2.). Bei einem derartigen spezifischen Einbau von [^{14}C]-Cholesterol wäre in Tigogenin nur entweder die 27-Methylengruppe oder dann die endständige 26-Methylgruppe radioaktiv.

Das nach Verabreichung von [1,7,15,22,26-^{14}C]-Cholesterol (11) erhaltene Tigogenin (12) (vgl. Kap. 1.1.) wurde mit Acetanhydrid in Pyridin acetyliert. Nach der anschliessenden Isomerisierung des radioaktiven 3-O-Acetyl-tigogenin mit n- Caprylsäure-Acetanhydrid resultierte bei der folgenden basischen Hydrolyse Pseudotigogenin (13) [27]. Nach Oxidation mit CrO_3-Eisessig und anschliessender alkalischer Hydrolyse mit NaOH in wässerigem Methanol wurden α-Methylglutarsäure (15) und Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (14) isoliert.

Nach dem Einbau dieses [^{14}C]-Cholesterolpräparats sind Radioaktivitäten an C-1, C-7, C-15, C-22, C-26 oder/und C-27 zu erwarten. Wie aus Formelschema 5 ersichtlich ist, muss α-Methylglutarsäure (15) 40 % und Δ^{16}-Pregnen-3,20--dion (14) 60 % der Radioaktivität enthalten. Das heisst, dass das Verhältnis 2:3 betragen muss.

Formelschema 5: Abbau von [^{14}C]-Tigogenin nach dem Einbau von[1,7,15,22,26-^{14}C]-Cholesterol (11)



Die experimentell bestimmten, relativen Aktivitäten von α-Methylglutarsäure (15) 39,6 % und Δ^{16}-Pregnen-3,20--dion (19) 61,5 % sowie das Verhältnis der Radioaktivitäten von 2:3,10 stimmen mit der Theorie sehr gut überein.

Die radioaktive α-Methylglutarsäure (15) wurde nach der Methode von Kuhn-Roth zu Essigsäure oxidiert [28]. Ein Schmidt-Abbau dieser Essigsäure lieferte radioaktives Methylamin, das mit Phenylisothiocyanat zu N-Phenyl-N'-[^{14}C]-methylthioharnstoff (16) umgesetzt wurde [29], und inaktives CO_2, resp. $BaCO_3$. Das radioaktive Methylamin wurde nicht nach den Angaben von Joly [14] als Pikrat isoliert, da dieses sich unter Licht- und Lufteinwirkung zersetzt. Ausserdem ist das Molekulargewicht von N-Phenyl-N'-[^{14}C]-methylthioharnstoff (16) geringer als dasjenige des Pikrates, sodass die zu erwartende Radioaktivität pro Masseneinheit etwas vergrössert werden konnte. Bei so geringen radioaktiven Messwerten, wie sie im vorliegenden Abbau auftraten, wäre der Einfluss der statistischen Schwankungen unvorteilhaft gross.

Da das isolierte Methylamin radioaktiv war und das Kohlendioxid keine Radioaktivität aufwies, befindet sich die [^{14}C]-Markierung ausschliesslich am C-Atom Nr. 26. Das C-Atom Nr. 27 ist infolgedessen in Tigogenin inaktiv. Damit ist erwiesen, dass der Ringschluss der Cholesterolseitenkette zur Spiroketalgruppierung streng stereospezifisch erfolgt.

Ueber die genauen Ergebnisse der Radioaktivitätsverteilung orientiert Tabelle 4.

Tabelle 4

Incorporation von [1,7,15,22-26-^{14}C]-Cholesterol in Tigogenin: Radioaktivitätsverteilung

Substanz-bezeichnung Nr.	Mol. gewicht	Radioaktivität in dpm [6] gemessen pro mg	gemessen pro mMol	berechnet pro mMol	relat. Aktivität in % gemessen	berechnet	Abweichung in %
Tigogenin	416	54	22'464	--	100	100	--
3-O-Acetyl-tigogenin	458	48	21'984	22'464	97,8	100	2,2
Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion	314	44	13'816	13'458	61,5	60	1,5
α-Methyl-glutarsäure	146	61	8'906	8'985	39,6	40	0,4
$BaCO_3$	198	0	0	0	0	0	0
N-Phenyl-N'-methyl-thio-harnstoff	166	26	4'316	4'493	19,2	20	0,8

6) Die Radioaktivitätsbestimmungen wurden von Herrn Dr. F. Kalberer im Isotopenlabor der Firma Sandoz A.G., Basel, ausgeführt, wofür an dieser Stelle bestens gedankt sei. (Methodik vgl. [30].

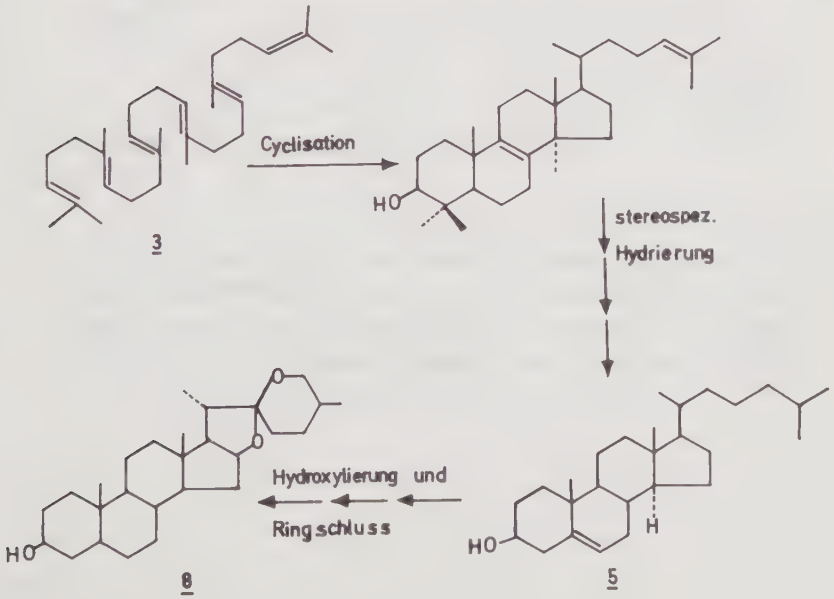
3. Diskussion der Resultate

3.1. Biogenese:

Aus den Werten der Radioaktivitätsbestimmungen, wie sie in Tabelle 4 zusammengestellt sind, geht hervor, dass Cholesterol (5) ohne Veränderungen des Grundgerüstes in die Steroidsapogenine eingebaut wird. Zum gleichen Resultat kamen kürzlich Joly et al. [31] und Caspi et al. [32] in unabhängigen Untersuchungen auf Grund des Einbaues von [4-^{14}C/25-^{3}H]-Cholesterol in Diosgenin, resp. Tigogenin. Die isolierten Steroidsapogenine wiesen dasselbe ^{14}C/^{3}H-Verhältnis auf, wie der "Precursor".

Da [^{14}C]-Cycloartenol (10) nicht in Tigogenin (8) eingebaut wird, müssen wir annehmen, dass die Hydroxylierung der 27-Methylgruppe nicht auf der Stufe eines Δ^{24}-Steroids erfolgt, sondern dass dieses zuerst stereospezifisch (vgl. Kap. 3.2.) hydriert wird. (Vgl. Formelschema 6).

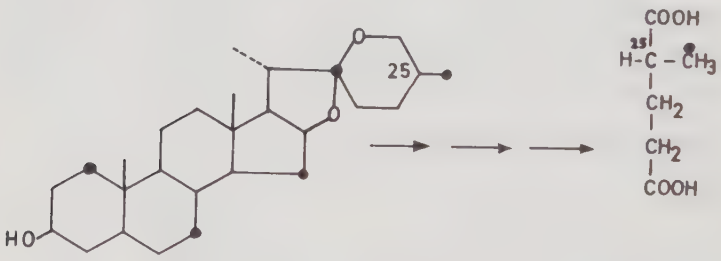
Formelschema 6: Zwischenstufen bei der Bildung von Tigogenin



3.2. Stereochemie:

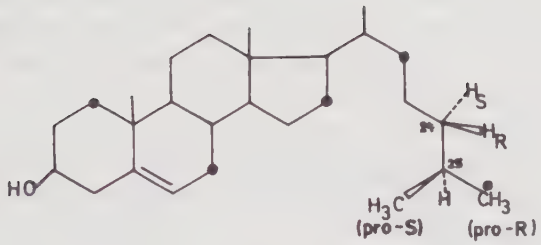
Die in Tabelle 4 zusammengestellten Werte beweisen im weiteren, dass die Bildung und Hydroxylierung des Cholesterols streng stereospezifisch verläuft. Die C-Atome Nr. 26 und 27 sind biogenetisch also nicht äquivalent. Die Hydroxylierung erfolgt stereospezifisch an derjenigen Methylgruppe des Cholesterols, welche keine [^{14}C]-Markierung trägt, also vom C-Atom Nr. 3 der Mevalonsäure stammt. Dieser Befund entspricht den Resultaten, die bei den verschiedenen Hydroxylierungsreaktionen von [^{14}C]-Cholesterol, das in Rattenleber aus [2-^{14}C]-Mevalonat aufgebaut wird, erhalten worden sind [33].

Der Abbau von Tigogenin (12) lieferte u.a. R-(-)-α-Methylglutarsäure (15) [34] (vgl. Kap. 2.1.).



12 15

Dieser Abbau erfolgte ohne Konfigurationsänderung am C-Atom Nr. 25. Daraus folgt, dass beim Einbau von [2-^{14}C]-Mevalonat in Cholesterol (11) die [^{14}C]-Markierung an der 25-pro-R-Methylgruppe [7] lokalisiert ist.



11

Bei der Biogenese entsteht bei der Cyclisation des Squalens ein ungesättigtes $\triangle^{24}$-Steroid. Die Reduktion der Doppelbindung dieser Vorstufe des Cholesterols erfolgt durch Aufnahme eines Protons an C-24 und einer Hydridwanderung von NADPH an C-25 [35]. Caspi et al. [36] konnten zeigen, dass das Wasserstoffatom, welches bei dieser Reduktion an C-24 gebunden wird, pro-S-Konfiguration [7] aufweist.

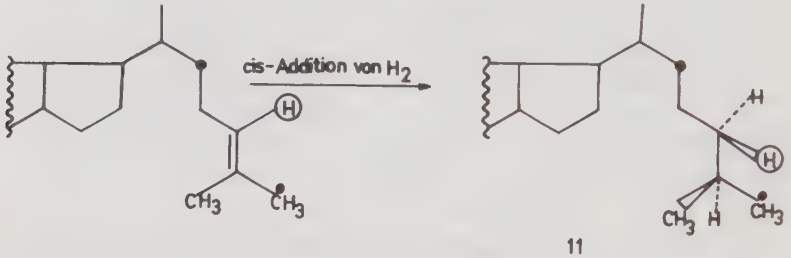
---

7) Prochiralität [37]:

Definition: Entsteht an einem nicht chiralen C-Atom beim Ersetzen eines Substituenten durch einen anderen ein asymmetrisches Zentrum, so war das ursprüngliche C-Atom pro-chiral.

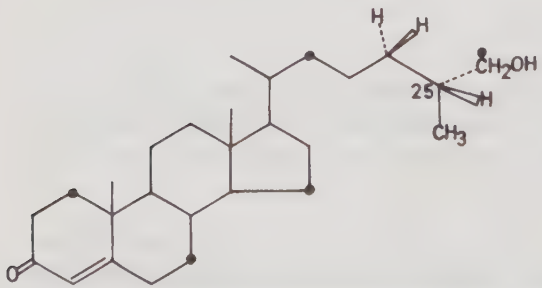
Bestimmung der Pro-Chiralität: Von zwei äquivalenten Substituenten, welche sich am pro-chiralen Zentrum befinden, wird bei der Sequenzfolge für die Cahn-Ingold-Regel [38] einer willkürlich bevorzugt. Das Zentrum, an dem sich dieser Substituent befindet, weist dann in Bezug auf denselben eine pro-S- oder pro-R-Konfiguration auf.

Das Wasserstoffatom an C-24 und die radioaktive Methylgruppe sind in der Δ^{24}-Vorstufe des Cholesterols cis-ständig [39] [40]. Daher entspricht die Reduktion dieser Doppelbindung einer cis-Addition von zwei Wasserstoffatomen:

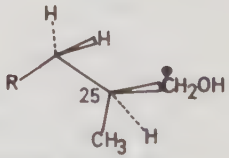


11

Caspi et al. gaben [^{14}C]-Cholesterol, welches in Rattenleber aus [2-^{14}C]-Mevalonat aufgebaut worden war, zu Kulturen von Mycobacterium smegmatis und isolierten anschliessend 26-Hydroxycholest-4-en-3-on (17).



17



16

25-R-Konfiguration

25-S-Konfiguration

Auf Grund von Messungen der optischen Drehungen von 26-Hydroxy-cholest-4-en-3-on (17) und von Vergleichssubstanzen vermuteten Caspi et al., dass dieses die 25-R-Konfiguration aufweist. In diesem Falle würde die Reduktion der Δ^{24}-Vorstufe des Cholesterols einer trans-Addition von Wasserstoff entsprechen. Dies widerspricht jedoch den oben beschriebenen, bei Tigogenin erhaltenen Resultaten. Um diesen Widerspruch zu klären, liess Caspi eine Röntgenstrukturanalyse des 26-p-Brombenzoylderivates seines 26-Hydroxycholest-4-en-3-ons (17) durchführen. Diese zeigte, dass die ursprünglich von ihm angenommene 25-R-Konfiguration falsch ist. Infolgedessen handelt es sich bei der enzymatischen Hydrierung des Δ^{24}-Vorläufers ebenfalls um eine cis-Addition [41].

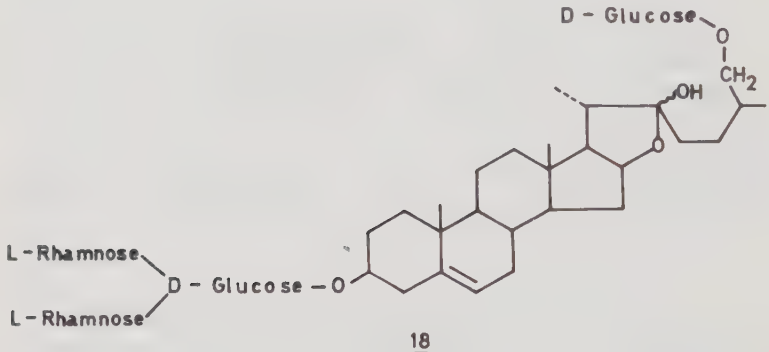
In Mycobacterium smegmatis erfolgt die Hydroxylierung einer endständigen Methylgruppe von [1,7,15,22,26-^{14}C]-Cholesterol (11) an derjenigen Methylgruppe, welche radioaktiv markiert ist [42], vgl. (17). Hingegen finden in Digitalis lanata (s. oben) und in Rattenleber [33] Oxygenierungsreaktionen an derjenigen endständigen Methylgruppe statt, welche nicht radioaktiv markiert ist.

3.3. Ausblick

Es wäre noch zu untersuchen, in welcher Form die Sauerstoffatome in Cholesterol eingeführt werden und der Ringschluss zum Spirostanol erfolgt.

R. Tschesche und R. Fritz [43] konnten zeigen, dass in Digitalis lanata Tigogenin aus 16β,26-Dihydroxycholesterol aufgebaut wird. Der Einbau von 26-Hydroxy-[26-^{14}C]-Cholesterol in das Steroidsapogenin Diosgenin bei Dioscorea floribunda-Pflanzen weist darauf hin, dass bei der Biogenese zuerst eine endständige Methylgruppe des Cholesterols oxidiert wird [44].

E. Heftmann et al. [45] isolierten aus Dioscorea floribunda nach der Verabreichung von [^{14}C]-Cholesterol ein radioaktives offenkettiges Glykosid des Steroidsapogenins Diosgenin, dem sie die Strukturformel 18 erteilten.



18

Wenn diese richtig ist, wäre es möglich, dass eine derartige Halbketalform an C-22 die Vorstufe des Spiroketalrings der Sapogenine darstellt.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeines

Alle Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert; Fehlergrenze ± 2°.

Substanzproben zur Messung der spezifischen Drehung und der IR.-Spektren wurden jeweils vor der Messung 2 Stunden im Hochvakuum bei 0,01 Torr und 60° getrocknet. Die Aufnahme der IR.-Spektren erfolgte mit einem Perkin-Elmer-IR-Gitterspektrophotometer, Modell 125 im Spektrallabor des Instituts für Organische Chemie (K. Aegerter). Substanzproben zur Elementaranalyse und Radioaktivitätsbestimmung wurden im Hochvakuum bei 0,01 Torr und 50° während 12 Stunden getrocknet. Wir verdanken die Analysen dem mikroanalytischen Laboratorium des Instituts für Organische Chemie (E. Thommen). Die Radioaktivitätsbestimmungen wurden von Herrn Dr. F. Kalberer im Isotopenlabor der Firma Sandoz A.G., Basel, ausgeführt [30], wofür auch an dieser Stelle bestens gedankt sei.

Zur Säulenchromatographie diente "Kieselgel 0,05 - 0,2 mm für die Chromatographie" der Firma E. Merck A.G., Darmstadt. Für die präparative Dünnschichtchromatographie benutzten wir "Kieselgel PF 254" (Fa. E. Merck) und für die Dünnschichtchromatographie "Kieselgel G nach Stahl" (Fa. E. Merck) unter Zusatz von Zinksilikat als Fluoreszenzindikator. Zur Sichtbarmachung von Substanzen auf Dünnschichtchromatogrammen wurde UV.-Licht verwendet; Steroidsapogenine konnten durch Besprühen mit Chlorsulfonsäure-Eisessig und kurzzeitiges Erwärmen auf 120 - 130°, Ketone durch 2,4-Dinitrophenylhydrazin-H_3PO_4--Aethanol-Sprühreagens (gelb-orange Flecken) sichtbar gemacht werden.

Uebliches Aufarbeiten bedeutet: Eindampfem im Vakuum, Aufnehmen des Eindampfrückstandes in Chloroform, Methylenchlorid oder Aether, Waschen mit 2$\underline{\underline{N}}$ HCl (bei CrO_3-Oxidation mit 2$\underline{\underline{N}}$ H_2SO_4), 2$\underline{\underline{N}}$ Na_2CO_3 und Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und erneutes Eindampfen der Lösung im Vakuum.

Die inaktiven Abbauprodukte wurden anhand der R_f-Werte der Dünnschichtchromatogramme, der Schmelzpunkte, der Mikroanalysen und der IR.-Spektren identifiziert und mit authentischem Material verglichen. Bei den radioaktiven Proben stimmten die R_f-Werte, die Schmelzpunkte und Mischschmelzpunkte mit denjenigen der inaktiven Abbauprodukte überein.

2. Isolierung der Sapogenine aus inaktivem Material

2.1. Isolierung der Saponine:

Die Blätter von 20 sechs Monate alten Digitalis lanata-EHRH.-Pflanzen wurden 40 Stunden bei 50° getrocknet. 66 g staubfein gemahlene Blätter liess man mit 750 ml H_2O während 20 Std. bei Zimmertemperatur stehen. Der Fermentationsbrei wurde nun mit 750 ml Alkohol-Wasser-Gemisch von steigendem Alkoholgehalt (50 - 98 %) heiss extrahiert. Vor dem jeweiligen Abnutschen der Blattrückstände wurde das Gemisch auf ca. 70° erwärmt. Die vereinigten Filtrate (8,25 Liter) wurden im Vakuum auf ca. 2,5 Liter eingeengt. Schütteln der Lösung mit $Pb(OH)_2$ während 20 Minuten diente zur Entfernung von mitextrahierten Begleitstoffen, wie Gerbstoffe und Tanine. Das $Pb(OH)_2$ wurde aus 200 g Bleiacetat frisch hergestellt. Nach dem Abnutschen über einem Hyflo-Bett wurde das Filtrat mit 2$\underline{\underline{N}}$ H_2SO_4 auf pH = 6 eingestellt und im Vakuum auf 425 ml eingeengt. Der Filterrückstand wurde dreimal mit je 300 ml Alkohol aufgeschlämmt. Die wässerigen Konzentrate wurden mit den $Pb(OH)_2$-Waschungen zu 2125 ml verdünnt. Nach dem Abfiltrieren von ausgefallenem $PbSO_4$ wurde das dunkelgrüne Filtrat extrahiert.

Petrolätherextrakt: Die Lösung wurde dreimal mit 500 ml Petroläther ausgeschüttelt, die Petroläther-Auszüge mit je 500 ml 80-proz. Alkohol gewaschen und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Es resultierten 567 mg Petrolätherextrakt, d.h. 0,86 % bezogen auf die getrockneten Blätter.

Chloroformextrakt: Nachdem die vereinigten alkoholisch-wässerigen Lösungen im Vakuum auf 240 ml eingeengt worden waren, wurden sie viermal mit je 500 ml Chloroform extrahiert. Die Chloroform-Auszüge wurden einmal mit 50 ml Wasser, einmal mit 50 ml 2$\underline{N}$ Na_2CO_3 und zweimal mit 50 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 resultierten beim Eindampfen 2,01 g Chloroformextrakt, d.h. 3 % bezogen auf die Trockensubstanz.

Chloroform-Alkoholextrakt: Die verbliebene wässerige Lösung wurde mit einer gleich grossen Menge gesättigter Na_2SO_4-Lösung versetzt und viermal mit je 750 ml Chloroform-Alkohol-(3:2) ausgezogen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen erhielt man 2,43 g Chloroform-Alkohol-Extrakt, d.h. 3,7 % bezogen auf die Trockensubstanz.

2.2. Hydrolyse der Saponine:

0,9 g Chloroform-Alkohol-Extrakt wurden mit 9 ml HCl-Eisessig-H_2O-(10:35:55) während 1,5 Std. bei 90 - 100° unter Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsprodukt wurde mit 120 ml Chloroform-Alkohol-(1:3) ausgeschüttelt. Dieser Auszug wurde mit 5 ml 2$\underline{N}$ Na_2CO_3 und 10 ml H_2O gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen erhielt man 0,542 g braunes Produkt. Dieses wurde bei 70° während einer Std. in 10 ml Methanol, welches 0,4 g KOH enthielt, einer Nachhydrolyse unterzogen. Nach der Zugabe von 15 ml H_2O dampfte man die Lösung im Vakuum auf 20 ml ein und extrahierte mit 200 ml Chloroform-Alkohol-(1:3). Nach Waschen der Auszüge mit 15 ml H_2O und der üblichen Aufarbeitung resultierten 155,1 mg gelbes Rohprodukt.

2.3. Isolierung von Tigogenin, Gitogenin und Digitogenin:

155 mg des obigen Rohprodukts wurden an 35 g Kieselgel chromatographiert. Die Eluierung erfolgte mit Benzol-Aether-(100:0,1 bis 0,1:100), wobei Fraktionen von je 25 ml aufgefangen wurden.

Die Fraktionen 6 - 9 ergaben 59,8 mg kristallines Tigogenin. Aus Aceton-Aether kristallisierte Tigogenin-Hydrat in farblosen Nadeln vom Smp. 205 - 206°; $[\alpha]_D^{22} = -66,0° \pm 2°$ (c = 1,0709 in Chloroform). Analyse:

$C_{27}H_{44}O_3 \cdot H_2O$ (434,6) Ber. C 74,63 H 10,58 %
Gef. C 74,61 H 10,62 %

Beim Trocknen während 12 Std. bei 60° und 0,01 Torr erhielt man die wasserfreie Verbindung.

Beim weiteren Eluieren mit Aether, der 20 % Chloroform-Methanol-Eisessig-(1:1:1) enthielt, resultierten 38,6 mg einer Mischfraktion, bestehend aus Gitogenin und Digitogenin.

Dieses Gemisch wurde nochmals auf 200 g Kieselgel aufgetragen und mit Methylenchlorid-Essigester-(2:3) eluiert. Es wurden Fraktionen von je 150 ml aufgefangen.

Die Fraktionen 20 - 29 lieferten 16,0 mg Gitogenin, das aus Chloroform-Alkohol umkristallisiert wurde. Smp. 272 - 273°.

Die Fraktionen 34 - 40 ergaben 9,8 mg Digitogenin, welches nach dem Umkristallisieren aus Chloroform-Aether-Petroläther-(1:1:1) bei 294 - 295° schmolz.

3. Isolierung der Sapogenine nach Verabreichung von [1,7, 15,22,26-^{14}C]-Cholesterol (11)

Die Extraktion und Aufarbeitung erfolgte analog zum inaktiven Material (Kap. 2.).

Aus 219,7 g getrockneten Blättern erhielt man total:

349,7 mg Tigogenin, Smp. 205°
21,4 mg Gitogenin, Smp. 271 - 273°
73,9 mg Digitogenin, Smp. 293 - 295°.

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden die Proben während 20 Std. bei 0,01 Torr und 60° getrocknet. Es wurden folgende Radioaktivitäten gemessen:

Tigogenin : 1. Kristallisat = 57 dpm/mg
2. Kristallisat = 53 dpm/mg
3. Kristallisat = 51 dpm/mg
4. Kristallisat = 55 dpm/mg

Gitogenin : 1. Kristallisat = 70 dpm/mg
2. Kristallisat = 77 dpm/mg

Digitogenin : 1. Kristallisat = 53 dpm/mg
2. Kristallisat = 51 dpm/mg

4. Abbau von [^{14}C]-Tigogenin nach der Incorporation von [1,7,15,22,26-^{14}C]-Cholesterol (11)

4.1. [^{14}C]-3-O-Acetyltigogenin aus [^{14}C]-Tigogenin (12):

41,0 mg (0,099 mMol) [^{14}C]-Tigogenin wurden in 10 ml Pyridin und 1,5 ml Acetanhydrid 24 Std. bei 23° stehengelassen. Nach Zugabe von ca. 2 cm^3 Eis bildete sich ein weisser Niederschlag, den man weitere 30 Min. stehen liess.

Nach üblichem Aufarbeiten erhielt man 43,2 mg [^{14}C]-3-O-Acetyltigogenin, das aus Isopropanol in farblosen Nadeln kristallisierte.

Smp. 203 - 204°; $[\alpha]_D^{22} = -63° \pm 2°$ (c = 1,0201 in Chloroform)

Radioaktivität: 1. Kristallisat = 47 dpm/mg
2. Kristallisat = 49 dpm/mg

4.2. [^{14}C]-Pseudotigogenin (13):

43 mg (0,093 mMol) [^{14}C]-3-O-Acetyltigogenin wurden mit 0,5 ml Caprylsäure und 0,1 ml Acetanhydrid in einem offenen Kölbchen langsam auf 150° erhitzt, wobei überschüssige Essigsäure verdampfte. Anschliessend erwärmte man die Lösung auf dem Metallbad während 3 Std. unter Rückfluss im N_2-Strom auf 250°.

Nach dem Abkühlen wurde die hellgelbe Lösung in 20 ml Aether aufgenommen und mit 5 ml 2$\underline{N}$ NaOH gewaschen. Nach üblichem Aufarbeiten wurde der Rückstand zur Hydrolyse mit 1 ml 5-proz. KOH in Methanol während 60 Min. unter Rückfluss erwärmt. Beim Verdünnen mit 5 ml heissem H_2O und anschliessender Filtration erhielt man 38 mg rohes Pseudotigogenin (PA 26), das aus Aceton (mit wenig H_2O) auskristallisierte (26,4 mg, 68,2 % d.Th.). Smp. 183 - 185°.

4.3. [^{14}C]-Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (14) und [^{14}C]-α-Methylglutarsäure (15):

Eine Lösung von 30 mg (0,072 mMol) [^{14}C]-Pseudotigogenin (13) in 1 ml Eisessig wurde mit 0,3 ml Oxidationslösung (1,93 g CrO_3 in 17,8 ml Eisessig) versetzt und 2 Std. bei 20° gerührt. Nach Zugabe von 8 ml H_2O bildete sich ein weisser Niederschlag, der in 100 ml Aether aufgenommen wurde. Uebliches Aufarbeiten ergab 33,6 mg Ketoester. Dieser wurde mit 0,5 ml Methanol und 1,5 ml 2$\underline{N}$ NaOH 20 Min. bei 80° unter Rückfluss hydrolysiert.

Nach Zugabe von 1,5 ml H_2O entstand ein weisser Niederschlag. Das Reaktionsgemisch wurde nach Erkalten mit Aether extrahiert bis die Aether-Extrakte im Dünnschichtchromatogramm nach Besprühen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin keine orange-braunen Flecke mehr ergaben. Die Aether-Lösung wurde über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Die Reinigung von

21,6 mg Rohprodukt erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie (Fliessmittel: Methylenchlorid mit 2 % Methanol). Nach Umkristallisieren aus Aceton-H_2O erhielt man 14,3 mg (65 % d. Th.) [^{14}C]-Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (14) vom Smp. 206 - 207°; $[\alpha]_D^{22}$ = + 72° ± 2° (c = 1,031 in Chloroform).

Radioaktivität: 1. Kristallisat = 44 dpm/mg
2. Kristallisat = 43 dpm/mg

Analyse:

$C_{21}H_{30}H_2$ (314,5) Ber. C 80,21 H 9,62 % Gef. C 79,81 H 9,64 %

Die wässerige Phase der oben erwähnten Extraktion wurde mit H_2SO_4 konz. auf pH = 1 eingestellt und im Kutscher-Steudel-Apparat während 48 Std. mit 40 ml Aether extrahiert. Die nach Trocknen und Eindampfen der Aether-Lösung erhaltene rohe Säure wurde im Sublimationskolben bei 90° und 0,01 Torr dreimal sublimiert. Es resultierten 5,9 mg (55 % d. Th.) [^{14}C]-α- Methylglutarsäure (15) vom Smp. 76 - 77°.

Radioaktivität: 1. Sublimat = 62 dpm/mg
2. Sublimat = 61 dpm/mg
3. Sublimat = 61 dpm/mg

Analyse:

$C_6H_{10}O_4$ (146,1) Ber. C 49,31 H 6,90 % Gef. C 49,14 H 6,82 %

Um statistische Schwankungen der geringen Aktivitäten möglichst zu eliminieren, wurden die oben erwähnten Reaktionen nochmals durchgeführt. Man erhielt dabei folgende Radioaktivitäten der Produkte:

[^{14}C]-Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (14): 1. Kristallisat = 43 dpm/mg
2. Kristallisat = 44 dpm/mg
3. Kristallisat = 45 dpm/mg

[^{14}C]-α-Methylglutarsäure (15): 1. Sublimat = 61 dpm/mg
2. Sublimat = 63 dpm/mg
3. Sublimat = 62 dpm/mg

4.4. Natrium-[^{14}C]-Acetat:

29 mg (0,199 mMol) [^{14}C]-α-Methylglutarsäure (15) wurden im Einschlussrohr mit 5,0 ml CrO_3-Lösung (10 g CrO_3, 60 ml H_2O, 12,5 ml H_2SO_4 konz.) während 2 Std. auf 125° erhitzt. Die entstandene Essigsäure wurde durch eine Wasserdampfdestillation vom Reaktionsgemisch abgetrennt. Es wurden 3 Destillate à 100 ml aufgefangen. Diese Destillate wurden mit genau eingestellter NaOH (0,01 N) gegen Phenolphtalein (2 Tropfen 1-proz. Lösung) titriert. Um den Einfluss des CO_2 zu eliminieren, wurden 3 Blindproben analog titriert. Dieser Verbrauch wurde bei der Essigsäure-Titration subtrahiert. Die ersten beiden Destillate enthielten zusammen 0,158 mMol Essigsäure, während das dritte keine Essigsäure mehr enthielt. Nach dem Eindampfen im Vakuum resultierten 12,9 g Natrium-[^{14}C]-Acetat.

4.5. Schmidt-Abbau des Natrium-[^{14}C]-Acetats:

12,9 g (0,158 mMol) Natriumacetat wurden in der von J. J. Britt [46] beschriebenen Apparatur mit 30 mg NaN_3 (0,46 mMol) und 0,9 g Polyphosphorsäure bei 80 - 90° unter öfterem Umschwenken während 2 Std. behandelt. Das gebildete CO_2 wurde in 25 ml $Ba(OH)_2$-Lösung, die nach den Angaben von R. A. Joly [14] hergestellt wurde, absorbiert. Nach 30 Min. konnte die $Ba(OH)_2$-Lösung abdekantiert werden. Das $BaCO_3$ wurde dreimal mit Wasser und zweimal mit Methanol gewaschen, abzentrifugiert und während 1,5 Std. unter der Quarzlampe getrocknet. Man erhielt 15,5 mg $BaCO_3$, welches überhaupt keine Radioaktivität aufwies.

Anschliessend wurde das Reaktionsgefäss mit einem Mikrokühler versehen, 5 ml 30-proz. NaOH zugegeben und unter Schütteln auf 120° erwärmt. Das sich bildende CH_3NH_2 wurde in eine Lösung von 0,12 g (0,74 mMol) Phenylisothiocyanat in 5 ml Alkohol eingeleitet [29]. Es wurden ca. 2 ml wässe-

riges Destillat aufgefangen. Beim Kühlen in Eis kristallisierte N-Phenyl-N'-[^{14}C]-methylthioharnstoff (16) in weissen Plättchen.

Nach Umkristallisieren aus Alkohol resultierten 15,8 mg (59,7 %) N-Phenyl-N'-[^{14}C]-methylthioharnstoff (16) vom Smp. 114°.

Radioaktivität: 1. Kristallisat = 26 dpm/mg
2. Kristallisat = 26 dpm/mg
3. Kristallisat = 26 dpm/mg

Analyse:

$C_8H_{10}N_2S$ (166,3) Ber. C 57,82 H 6,07 % Gef. C 57,91 H 6,12 %

C. ZUSAMMENFASSUNG

Es ist bekannt, dass die Steroid-Sapogenine in Digitalis-Pflanzen aus Mevalonsäure aufgebaut werden, wobei die 26-Methylgruppe aus C-2 und die 27-Methylengruppe aus C-3 der Mevalonsäure stammen. Als C_{27}-Zwischenstufe kommen neben Cholesterol Δ^{24}-Sterole wie Desmosterol (9) oder Cycloartenol (10) in Frage. Sie würden einen stereospezifischen Ringschluss zum Spirostanol-System ermöglichen. Um diese Frage abzuklären, wurden [28-^{14}C]-Cycloartenol (10) sowie [1,7,15,22,26-^{14}C]-Cholesterol (11), das in Rattenleber aus [2-^{14}C]-Mevalonat biosynthetisiert worden war, ausgesuchten Pflanzen von Digitalis lanata EHRH. verabreicht und die Spirostanole Tigogenin, Gitogenin und Digitogenin isoliert. Die nach Verabreichung des Cycloartenols (10) isolierten Spirostanole wiesen keine Radioaktivität auf. Hingegen waren die nach Gabe von Cholesterol (11) erhaltenen Spirostanole radioaktiv.

Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung wurde Tigogenin einem chemischen Abbau unterworfen. Zu diesem Zwecke wurde [^{14}C]-3-O-Acetyltigogenin in Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (14) und α-Methylglutarsäure (15) übergeführt. Das Radioaktivitätsverhältnis der beiden Bruchstücke von 2:3,10 entsprach den Erwartungen. Dies beweist, dass Cholesterol ohne Veränderung des Grundgerüstes in Tigogenin eingebaut wurde. Der Kuhn-Roth-Abbau der α-Methylglutarsäure (15) lieferte radioaktive Essigsäure. Diese wurde nach Schmidt in Methylamin und CO_2 übergeführt. Während das CO_2 (isoliert als $BaCO_3$) nicht radioaktiv war, enthielt das Methylamin (isoliert als N-Phenyl-N'-methylthioharnstoff (16) die gesamte Aktivität der Essigsäure, resp. die Hälfte derjenigen von α-Methylglutarsäure (15).

Die Resultate zeigen, dass Cholesterol die C_{27}-Vorstufe von Tigogenin darstellt und ohne Veränderung des Grundge-

rüstes - z.B. Abbau und Resynthese - in die Spirostanole eingebaut wird. Die 26- und 27-Methylgruppen sind biogenetisch nicht äquivalent. Die Oxygenierung findet ausschliesslich an der aus C-3 der Mevalonsäure stammenden 27-Methylgruppe statt. Diese besitzt auf Grund der bekannten Konfiguration der α-Methylglutarsäure (15) pro-S-Konfiguration. Daraus folgt, dass die Reduktion der Δ^{24}-Doppelbindung der ungesättigten Vorstufe des Cholesterols eine cis-Addition von zwei Wasserstoffatomen darstellt.

Dieser Befund widersprach den Resultaten von Caspi et al., die auf Grund der Bildung von 26-Hydroxycholest-4-en-3-on (17) trans-Addition postuliert hatten. Nachdem sich die von Caspi et al. vorgenommene Konfigurationsbestimmung von 17 aber als falsch erwiesen hat, sind seine Resultate im Einklang mit den hier beschriebenen.

D. LITERATURVERZEICHNIS

[1] Vgl. L. F. Fieser & M. Fieser, "Steroide", Verlag Chemie Weinheim/Berstr. 1961.

[2] Vgl. Strassburger, "Lehrbuch der Botanik", bearbeitet von R. Harder, F. Firbas, W. Schumacher & D. von Denfer, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1958.

[3] a) W. Karrer: "Konstitution und Vorkommen der org. Pflanzenstoffe", Birkhäuser Verlag, Basel, 1958.

b) T. Reichstein, Die Naturwissenschaften 1967, 53.

[4] G. Willuhn, Pharm. Ztg. 110, 96 (1965).

[5] E. Heftmann, Annual. Rev. Plant Physiol. 14, 225 (1963).

[6] J. von Euw & T. Reichstein, Helv. Chim. Acta 47, 711 (1964).

[7] R. Tschesche, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe 12, 131, Springer-Verlag, Wien, 1955.

[8] J.A.F. Wickramasinghe, P. C. Hirsch, S. M. Munavalli & E. Caspi, Biochem. 7, 3248 (1968).

[9] R. Tschesche, G. Lilienweiss, Z. Naturf. 196, 265 (1964).

[10] R. Tschesche, R. Hombach, H. Scholte, M. Peters, Phytochemistry 9, 1505 (1970).

[11] R. D. Bennett, E. Heftmann, W. H. Preston Jr., J. R. Haun, Arch. Biochem. Biophys. 103, 74 (1963).

[12] J. v. Euw., T. Reichstein, Helv. Chim. Acta 49, 1468 (1966).

[13] E. Heftmann, R. D. Bennett, J. Bronner, Arch. Biochem. Biophys. 92, 13 (1961).

[14] a) R. Joly & Ch. Tamm, Tetrahedron Letters 1967, 3535; 1968, 896.

b) R. Joly, Diss. Basel, 1967.

[15] C. M. Jacobsohn & M. J. Frey, Arch. Biochem. Biophys. 127 655 (1968).

[16] G. Ponsinet, G. Ourisson, Phytochemistry 6, 1235 (1967).

[17] M. J. E. Hewlins, Jean Ehrhardt, Eur. J. Biochem. 8, 184 (1969).

[18] J. Hall, A. R. H. Smith, L. J. Goad, T. W. Goodwin, Biochem. J. 112, 129 (1969).

[19] L. J. Goad, T. W. Goodwin, Eur. J. Biochem. 7, 502 (1969).

[20] R. D. Bennett & E. Heftmann, Phytochemistry 4, 475 (1965).

[21] R. D. Bennett & E. Heftmann, Phytochemistry 4 577 (1965).

[22] J. A. F. Wickramasinghe, P. C. Hirsch, S. M. Munavalli, E. Caspi, Biochem. 7, 32 48 (1968).

[23] E. Caspi, D. O. Lewis, D. M. Piatak, K. V. Thimann, A. Winter, Exp. 12, 506 (1966).

[24] A. O. Chaudhuri, Y. Harada, R. J. Dorfman, J. Biol. Chem. 237, 703 (1962).

[25] H. Kiliani, Ber. deutsch. chem. Ges. 63, 2866 (1930).

[26] R. Tschesche, H. Hulpke, R. Fritz, Phytochemistry 7, 2021 (1968).

[27] A. F. B. Cameron, R. M. Evans, J. C. Hamlet, J. S. Hunt, P. G. Jones & A. G. Long, J. Chem. Soc. 1955, 2807.

[28] a) R. Kuhn & F. L'Orsa, Angew. Chem. 44, 847 (1931).
b) Pregl & Roth: Quantitative organische Mikroanalyse, 7. Auflage, Verlag Springer 1958.

[29] A. I Vogel, "Practical Organic Chemistry", Verlag Longmans,Green and Co., London (1948), Seite 415.

[30] F. Kalberer & J. Rutschmann, Helv. 44, 1956 (1961).

[31] R. A. Joly, J. Bonner, R. D. Bennett und E. Heftmann, Phytochemistry, 8, 1709 (1969).

[32] E. Caspi, persönliche Mitteilung an Herrn Prof. Dr. Ch. Tamm.

[33] a) O. Berseus, Acta Chem. Scand. 19, 325 (1965);
b) K. A. Mitropoulos and N. B. Myant, Biochem. J. 97, 26C (1965).

[34] V. H. T. James, J. Chem. Soc. 1955, 637.

[35] M. Akhtar, K. A. Munday, A. D. Rahimtula, J. A. Watkinson and D. C. Wilton, Chem. Comm. 1969, 1287.

[36] a) E. Caspi, K. R. Varma and J. B. Greig, Chem. Comm. 1969, 45;
b) J. B. Greig, K. R. Varma, E. Caspi, JACS 93, 760 (1971).

[37] K. R. Hanson, J. Amer. Chem. Soc. 88, 2731 (1966).

[38] R. S. Cahn, Christopher Ingold, V. Prelog, Angew. 78, 413 (1966).

[39] K. J. Stone, W. R. Roeske, R. B. Clayton, E. E. van Tamelen, Chem. Comm. 1969, 530.

[40] A. J. Birch, M. Kocor, M. Sheppard and J. Winter, J. Chem. Soc. 1962, 1502.

[41] E. Caspi, The Worcester Foundation for Experimental Biology, Shrewsbury Mass., U.S.A., persönl. Mitteilung an Herrn Prof. Dr. Ch. Tamm, 17.5.1971.

[42] E. Caspi, M. Galli Kienle, K. R. Varma, L. J. Mulheirn, J. Amer. Chem. Soc. 92, 2161 (1970).

[43] R. Tschesche und R. Fritz, Z. Naturf. 25b, 590 (1970).

[44] R. D. Bennett, E. Heftmann, R. A. Joly, Phytochemistry 9, 349 (1970).

[45] R. A. Joly, J. Bonner, R. D. Bennett, E. Heftmann, Phytochemistry 8, 857 (1969).

[46] J. J. Britt, Diss. ETH Nr. 2948 (ETH, Zürich) "Ueber die Biogenese von Rosenonolacton".

II. Teil: Untersuchungen über die Biogenese der Homo-isoflavone

II. Untersuchungen über die Biogenese der Homo-isoflavone

Seite

A. THEORETISCHER TEIL 1

I. Einleitung und Problemstellung 1

II. Synthese und chemischer Abbau von 5,7-Di-O-methyleucomin 7

1. Synthese 7

2. Chemischer Abbau 8

III. Incorporationsversuche bei Eucomis punctata L'Hérit. und Eucomis bicolor Bak. 12

1. Zeitpunkt und Dauer der Incorporation der radioaktiven "Precursors" 13

2. Isolierung der Homo-isoflavone 13

2.1. Homo-isoflavone aus Eucomis punctata L'Hérit. 13

2.2. Homo-isoflavone aus Eucomis bicolor Bak. 14

3. Incorporation von Natrium-[1-^{14}C]-acetat 14

4. Incorporation von [Methyl-^{14}C]-L-Methionin 15

5. Diskussion der Resultate 20

B. EXPERIMENTELLER TEIL 22

1. Allgemeines 23

2. Synthese von 5,7-Di-O-methyleucomin 23

Seite

2.1. 2,4-Di-O-methylphloroacetophenon 23
2.2. 5,7-Dimethoxy-2-hydroxychroman-4-on 23
2.3. 5,7-Dimethoxychromon 23
2.4. 5,7-Dimethoxychroman-4-on 24
2.5. 5,7-Di-O-methyleucomin 24

3. Abbau von 5,7-Di-O-methyleucomin 25

3.1. Isomerisierung von 5,7-Di-O-methyleucomin 25
3.2. Abbau von 3(2)-Anhydro-5,7-di-O-methyleucomol 26
3.3. S-Benzylisothiuronium-formiat 27
3.4. Methylierung von 2',4',4-Tri-O-methylphloretin 27
3.5. Oxidation von 2',4',6'-4-Tetra-O-methylphloretin 28

4. Isolierung der bekannten Homo-isoflavone und des 7-O-Methyleucomols 29

C. ZUSAMMENFASSUNG 31

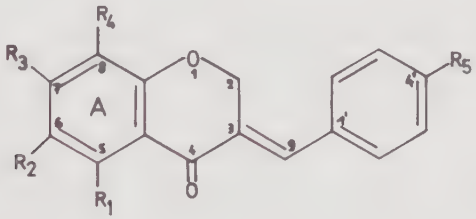
D. LITERATURVERZEICHNIS 33

E. CURRICULUM VITAE 35

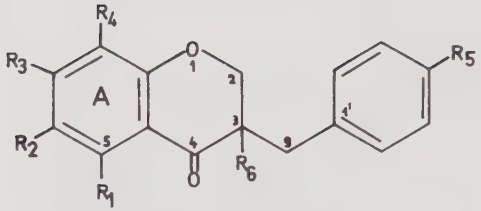
A. THEORETISCHER TEIL

I. Einleitung und Problemstellung

Aus den Zwiebeln der Gattung Eucomis - einer Liliaceae, welche vor allem in Südafrika beheimatet ist [1] - ist kürzlich von Tamm und Mitarbeitern eine neue Gruppe von Naturstoffen isoliert worden, die als Homo-isoflavone bezeichnet wurden. Es handelt sich um Eucomin (1), Eucomol (2), Eucomnalin (3), 4'-O-Methylpunctatin (4), 3,9-Dihydroeucomnalin (5), Punctatin (6), 4'-Demethyleucomin (7), 3,9-Dihydropunctatin (8), 4'-O-Methyl-3,9-dihydropunctatin (9) und 4'-Demethyl-5-O-methyl-3,9-dihydroeucomin (10), die in den Arten Eucomis bicolor Bak., E. autumnalis Graeb. und E. punctata L'Hérit. auftreten [1] [2] [3] [4].



(1)	R_1=OH	R_2=H	R_3=OH	R_4=H	R_5=OCH_3
(4)	R_1=OH	R_2=H	R_3=OH	R_4=OCH_3	R_5=OCH_3
(6)	R_1=OH	R_2=H	R_3=OH	R_4=OCH_3	R_5=OH
(7)	R_1=OH	R_2=H	R_3=OH	R_4=H	R_5=OH
(3)	R_1=OH	R_2=OCH_3	R_3=OH	R_4=H	R_5=OH



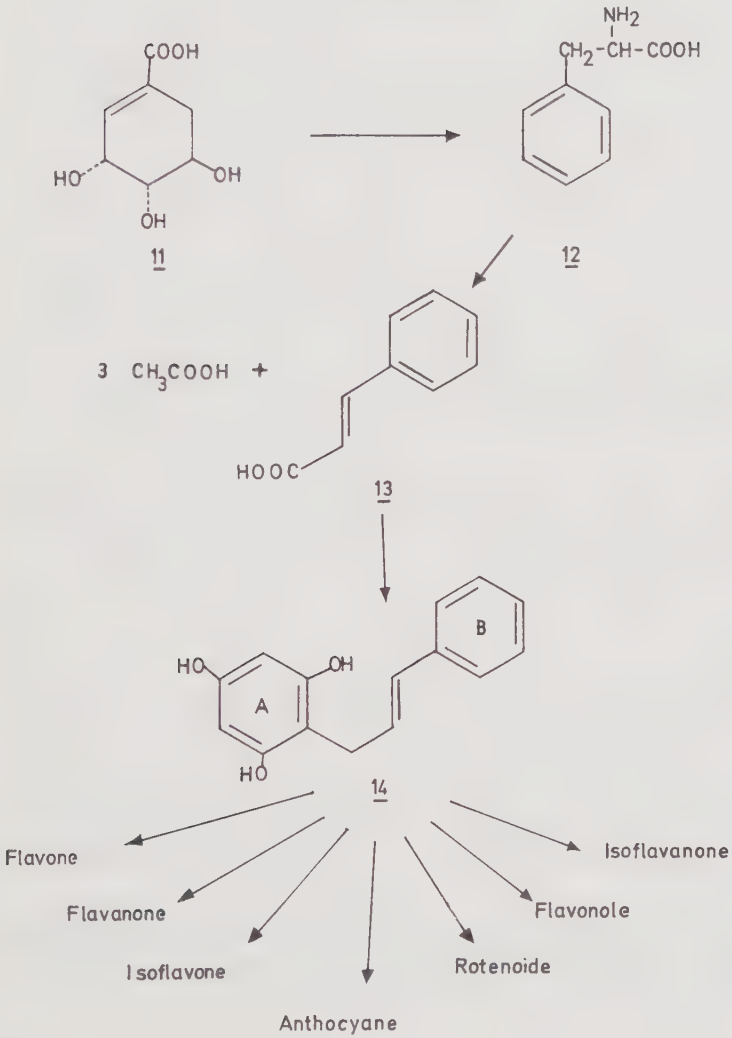
(2)	R_1=OH	R_2=H	R_3=OH	R_4=H	R_5=OCH_3	R_6=OH
(9)	R_1=OH	R_2=H	R_3=OH	R_4=OCH_3	R_5=OCH_3	R_6=H
(8)	R_1=OH	R_2=H	R_3=OH	R_4=OCH_3	R_5=OH	R_6=H
(5)	R_1=OH	R_2=OCH_3	R_3=OH	R_4=H	R_5=OH	R_6=H
(10)	R_1=OCH_3	R_2=H	R_3=OH	R_4=H	R_5=OH	R_6=H

Die bisher isolierten Verbindungen unterscheiden sich voneinander durch das Verteilungsmuster der Hydroxyl- und Methoxylgruppen im Grundgerüst, sowie durch die verschiedenen Oxidationsstufen der C-Atome Nr. 3 und 9. Ist R_6 ein H-Atom oder eine Hydroxylgruppe, so sind die Naturstoffe optisch aktiv.

Auf Grund der strukturellen Aehnlichkeit der Homo-isoflavone mit den Flavonoiden ist zu erwarten, dass die Biogenese in beiden Stoffklassen ähnlich verläuft. In welcher Form und an welcher Stelle das zusätzliche C-Atom im Molekül der Homo-isoflavone eingebaut wird, ist jedoch noch völlig ungewiss.

Die Biogenese der Flavonoide ist relativ gut untersucht. Der aromatische Ring A wird aus drei Acetat-Einheiten aufgebaut [5]. Als Vorstufen der C_9-Einheit, welche den Ring B enthält, sindaie Shikimisäure (11) [6], Phenylalanin (12) und Zimtsäure (13) [7] nachgewiesen worden. Die Kombination der

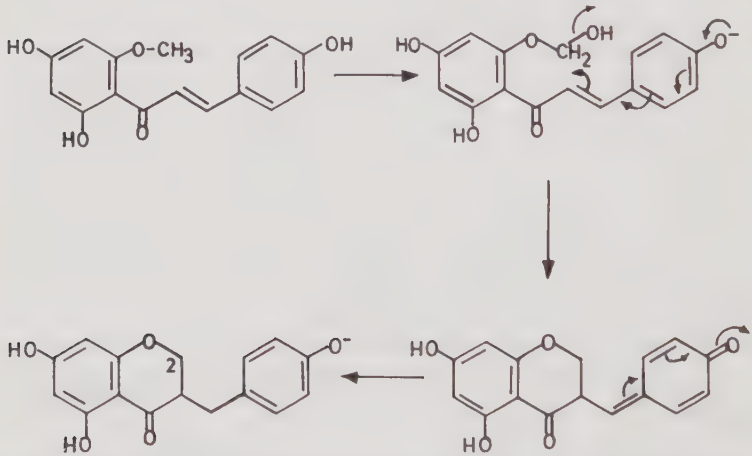
Formelschema 1: Biogenese der Flavonoide:



C_6- und C_9-Teile ergibt ein Chalkon (14) als Zwischenprodukt [8], aus dem die Flavonoide und zahlreiche verwandte Stoffe entstehen [9]. Vgl. Formelschema 1.

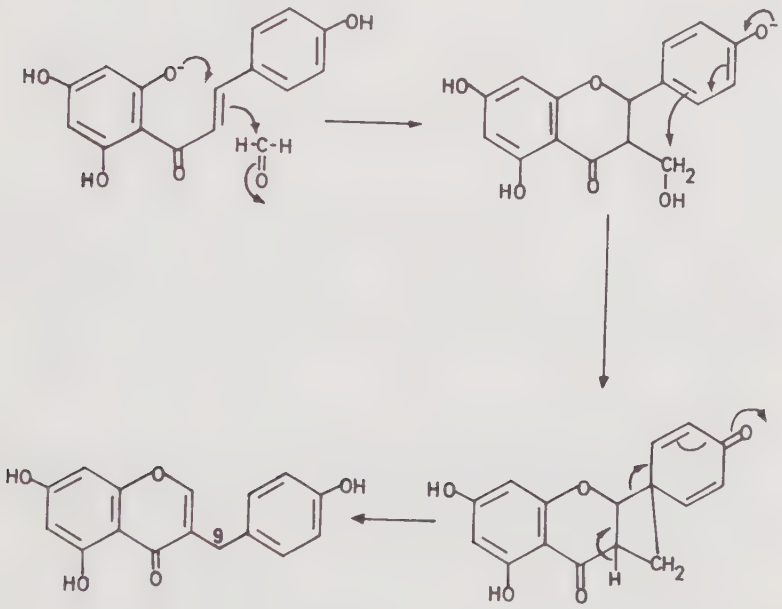
Erfolgt die Biogenese der Homo-isoflavone analog derjenigen der Flavonoide, so wird zuerst ein Chalkon (14) aufgebaut. Durch den anschliessenden Einbau eines weiteren C-Atoms und einer Ringschlussreaktion entsteht das Homo-isoflavon. Bei den verwandten Rotenoiden ist der Lieferant der zusätzlichen C_1-Einheit Methionin [10].

Bei den Homo-isoflavonen könnte der Einbau der C_1-Einheit z. B. durch Methylierung der 2'-Hydroxygruppe eines Chalkons (14) erfolgen. Anschliessender Ringschluss ergäbe das Gerüst der Homo-isoflavone. Dies würde bedeuten, dass das C-Atom Nr. 2 die zusätzliche C_1-Einheit darstellt:



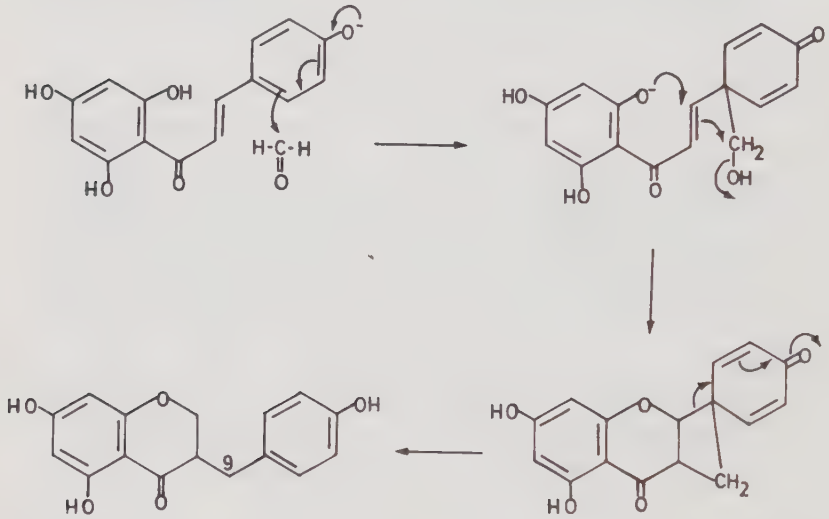
Analoge Reaktionen sind für die Biogenese von Opium-Alkaloiden vorgeschlagen [11] und bei Quercetin, einem Flavon, in vitro beobachtet worden [12].

Theoretisch ebenfalls möglich wäre eine Hydroxymethylierung der α-Methingruppe des Chalkons (14). Anschliessender Ringschluss und Wanderung des Arylrests an diese Hydroxymethylgruppe würde zum Homo-isoflavon führen. Bei dieser Reaktionsfolge wäre das C-Atom Nr. 9 des Homo-isoflavons die zusätzliche C_1-Einheit:



Hier würde eine 1,3-Arylwanderung auftreten; bei der Bildung der Isoflavone findet hingegen eine 1,2-Arylwanderung statt [13].

Würde im Ring B eines Chalkons die C_1-Einheit in p-Stellung zur 4'-Hydroxygruppe eingebaut, so könnte durch eine Folgereaktion ebenfalls ein Homo-isoflavon aufgebaut werden. In diesem Fall würde die C_1-Einheit wiederum dem C-Atom Nr. 9 des Homo-isoflavons entsprechen:



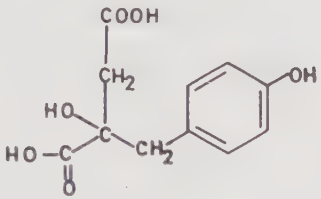
Aehnliche Ringschlussreaktionen sind von R. B. Woodward für die Biogenese der Alkaloide Canadin, Laudanosin oder Yohimbin vorgeschlagen worden [14].

Es ist aber auch möglich, dass die Biosynthese der Homo-isoflavone nicht analog derjenigen der Flavonoide verläuft und kein Chalkon als Zwischenstufe auftritt. Die kürzlich von Heller [1)] aus Eucomis punctata L'Hérit. isolierte 2-(p-Hydroxybenzyl)-äpfelsäure (15) könnte eine biogenetische

---

1) W. Heller, Org. Institut, Universität Basel, persönliche Mitteilung.

Vorstufe der Homo-isoflavone darstellen.



15

Um abzuklären, ob die Biogenese der Homo-isoflavone nach einem der diskutierten Wege verläuft, müssen den Eucomis-Pflanzen entsprechende Bausteine, z. B. radioaktives Acetat, Methionin, Chalkone, 2-(p-Hydroxybenzyl)-äpfelsäure, verabreicht werden. Erfolgt ein Einbau dieser "Precursors" in die Homo-isoflavone, so muss mittels eines chemischen Abbaus abgeklärt werden, an welcher Stelle der Molekel sich die Radioaktivität befindet.

Zu diesem Zwecke musste zunächst eine ergiebige Synthese eines Homo-isoflavons ausgearbeitet werden, um genügend Material für den gezielten chemischen Abbau zu erhalten. Nach Erreichen dieses ersten Ziels galt es, die optimalen Bedingungen für den Einbau der radioaktiven "Precursors" zu ermitteln.

II. Synthese und chemischer Abbau von 5,7-Di-O-methyleucomin

1. Synthese

Als Homo-isoflavon schien 5,7-Di-O-methyleucomin aus folgenden Gründen am geeignetsten. Im Rahmen der Strukturaufklärung von Eucomin und Eucomol führte Böhler [2] mit diesem Derivat des Eucomins bereits eine Abbaureaktion durch,

bei der das C-Atom Nr. 9 in Form von Ameisensäure freigesetzt wurde. Die Erfassung dieses C-Atoms ist für die Abklärung der Biogenese sehr wichtig. Ferner lassen sich aus Eucomis bicolor Bak. im Verhältnis grosse Mengen Eucomin und Eucomol isolieren. Diese beiden Verbindungen können relativ leicht in 5,7-Di-O-methyleucomin übergeführt werden.

5,7-Di-O-methyleucomin (21) ist ein Benzylidenchroman--4-on-Derivat. Diese lassen sich durch Kondensation eines Chroman-4-ons mit einem aromatischen Aldehyd in Gegenwart von Basen oder Säure gewinnen.

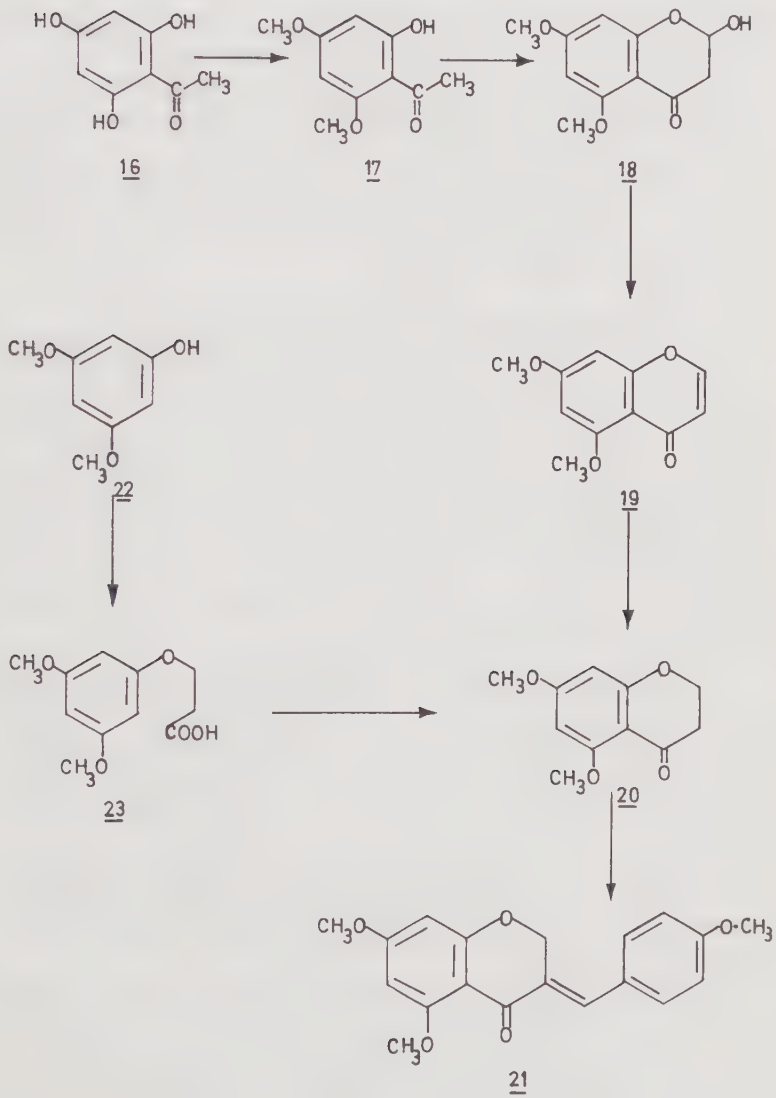
Die Synthese von 5,7-Dimethoxychroman-4-on (20) aus Di--O-methylphloroglucin (22) und β-Chloressigsäure [2] ist wegen der geringen Ausbeuten ungeeignet. Ferner liess sich das Zwischenprodukt, die β-(3,5-Dimethoxyphenoxy)-propionsäure (23) schlecht reinigen, sodass wir nach dieser Methode nur schwer reines 5,7-Dimethoxychroman-4-on darstellen konnten.

Bessere Resultate lieferte die Synthese ausgehend von Phloroacetophenon (16). Durch Methylierung mit Dimethylsulfat in Aceton entstand daraus 2,4-Di-O-methylphloroacetophenon (17). Die Methylierung der dritten Hydroxylgruppe ist wegen einer Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff erschwert. Eine Kondensation mit Ameisensäureäthylester in Xylol in Gegenwart von geschmolzenem Natrium lieferte anschliessend 5,7-Dimethoxy-2-hydroxychroman-4-on (18). Die Wasserabspaltung gelang mit konz. H_2SO_4 in Aethanol. Das erhaltene 5,7-Dimethoxychromon (19) wurde mit Pd-C als Katalysator zu 5,7-Dimethoxychroman-4-on (20) hydriert. Kondensation von 20 mit Anisaldehyd ergab das gewünschte 5,7-Di-O-methyleucomin (21). Vgl. Formelschema 2.

2. Chemischer Abbau

Auf Grund der einleitenden Ueberlegungen zur Biogenese der Homo-isoflavone war ein chemischer Abbau von 5,7-Di-O-

Formelschema 2: Synthese von 5,7-Dimethyleucomin



methyleucomin (21) erforderlich, der die einzelne Erfassung der C-Atome Nr. 2, 3, 4 und 9 gestattet.

5,7-Di-O-methyleucomin (21) wurde in abs. Aether mit K-t-Butoxid unter Stickstoff zu 3(2)-Anhydro-5,7-di-O-methyleucomol (24) isomerisiert. Die Abspaltung der Ameisensäure in 24 gelang mit Natriumhydroxid in wässerigem Alkohol.

Die isolierte Ameisensäure wurde mit NaOH neutralisiert. Das Natriumsalz reagierte mit einer wässerigen Lösung von S-Benzylisothiuroniumchlorid zu kristallinem S-Benzylisothiuroniumformiat (25) [17].[2)]

Das bei der Abspaltung der Ameisensäure entstandene 2',4',4-Tri-O-methylphloretin (26) wurde mit Dimethylsulfat in Aceton methyliert. Oxidation mit $KMnO_4$ des erhaltenen 2',4',6',4-Tetra-O-methylphloretins (27) lieferte p-Methoxybenzoesäure (28) und 2,4,6-Trimethoxy-benzoesäure (29). Durch präparative Dünnschichtchromatographie konnte p-Methoxybenzoesäure (28) aus dem Gemisch der beiden Säuren abgetrennt werden.

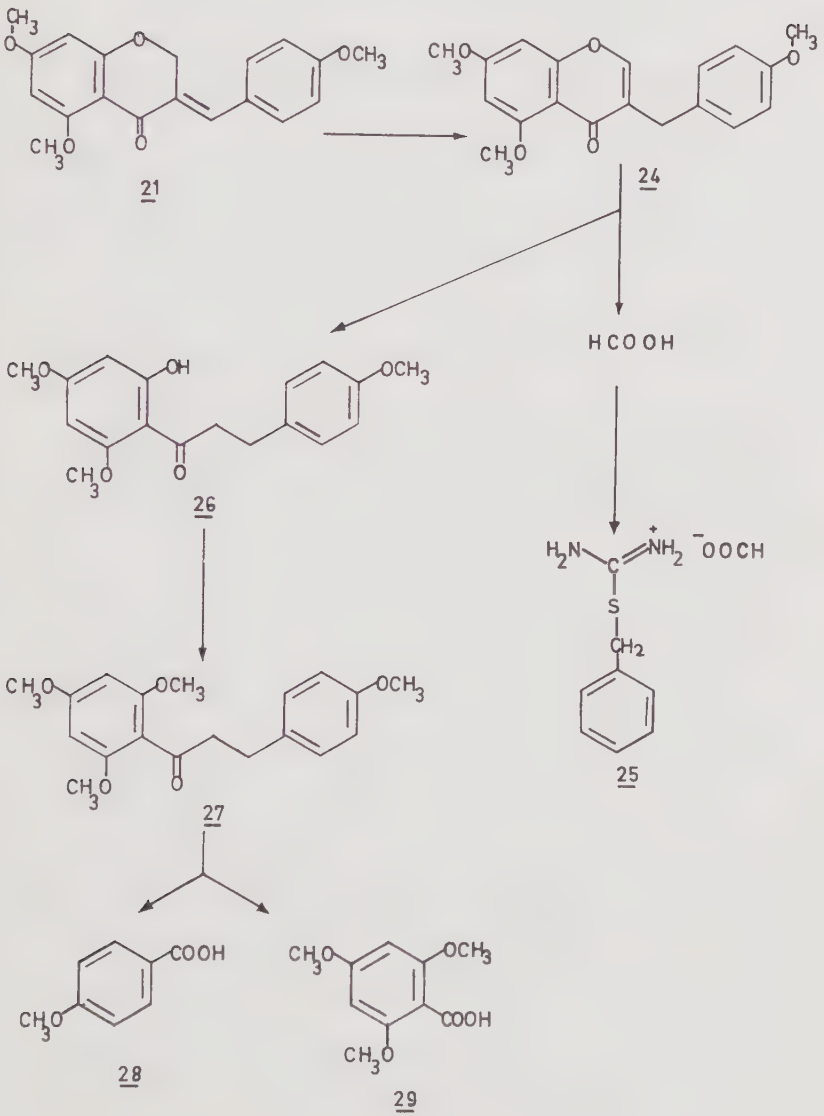
Die Abbaureaktionen und deren Ausbeuten sind im Formelschema 3 zusammengefasst.

Mit diesem Abbau lassen sich die C-Atome Nr. 2 (S-Benzylisothiuroniumformiat), Nr. 4 (2,4,6-Trimethoxybenzoesäure) und Nr. 9 (p-Methoxybenzoesäure) eindeutig erfassen. Das C-Atom Nr. 3 wurde wahrscheinlich als CO_2 freigesetzt, konnte aber nicht isoliert werden. Würde sich im radioaktiven Homoisoflavon die [^{14}C]-Markierung auf diesem C-Atom befinden, so liesse sich dies dadurch feststellen, dass nach dem chemischen Abbau keines der erwähnten anderen Abbauprodukte radioaktiv sein sollte.

---

2) Mit p-Bromphenacylbromid entstand bei der Reaktion mit einer alkoholischen Natriumformiatlösung kein p-Bromphenacylester. Dieser Ester bildet sich nur sehr schwer, da vorwiegend p-Bromphenacylalkohol entsteht [18].

Formelschema 3: Abbau von 5,7-Di-O-methyleucomin



III. Incorporationsversuche bei Eucomis punctata L'Hérit. und Eucomis bicolor Bak.

1. Zeitpunkt und Dauer der Incorporation der radioaktiven "Precursors"

Um einen möglichst guten Einbau der radioaktiven "Precursors" in die Homo-isoflavone zu erreichen, wurden in zahlreichen Vorversuchen Natrium-[1-^{14}C]-acetat und [Methyl-^{14}C]--L-Methionin an Eucomis-Pflanzen unter verschiedenen Wachstums- und Incorporationsbedingungen verabreicht. Auf Grund der Einbauraten ergaben sich die optimalen Bedingungen für die Hauptversuche.

Jeweils 1 - 2 Eucomis-Zwiebeln [3] wurden in Töpfe gepflanzt und bei 10 - 15° feucht gehalten. Nach ca. 3 Wochen zeigten die Zwiebeln gute Wurzelbildung; man liess sie bei 20 - 30° weiterwachsen. Bei der Verabreichung der radioaktiven Substanzen wurden folgende Bedingungen variiert:

1. Grösse der Pflanzen:
   - Grösse 1: Pflanzen mit 2 Blättern von ca. 5 cm Länge, 6 Wochen alt;
   - Grösse 2: Pflanzen mit 5 Blättern von 15 - 20 cm Länge, 6 - 8 Wochen alt;
   - Grösse 3: Pflanzen mit 6 Blättern, welche max. 45 cm lang sind, 7 - 9 Wochen alt.

2. Incorporationsdauer: Nachdem der "Precursor" verabreicht worden war, liess man die Pflanzen 14 Tage oder 24 Tage wachsen. Anschliessend erfolgte die Aufarbeitung.

---

3) Die Zwiebeln wurden von der Firma Van Tubergen, Haarlem, Holland, bezogen und bis zur Verwendung bei 0° im Dunkeln gelagert.

3. Verabreichungsmethode:

"Wurzelmethode": 2 Wurzeln der Zwiebel wurden in ein Reagenzglas, welches 0,25 1 ml radioaktive Lösung enthielt, eingetaucht. Der "Precursor" sollte durch die Wurzeln aufgenommen werden.

"Injektionsmethode": Mit einer Injektionsspritze wurde an verschiedenen Stellen seitlich vom Trieb total 0,25 ml radioaktive Lösung in die Zwiebeln eingespritzt. Die Lösung sollte sich zwischen den Zwiebelschuppen, an deren Aussenseite die Homo-isoflavone ausgeschieden werden, verteilen.

2. Isolierung der Homo-isoflavone

Die Zwiebelschalen, an deren Aussenseite sich die Homo-isoflavone befinden, wurden einzeln abgetrennt und in einer Soxhlet-Apparatur mit Aether extrahiert. Man erhielt einen Rohextrakt, der praktisch nur Homo-isoflavone enthielt.

2.1. Homo-isoflavone aus Eucomis punctata L'Hérit.

Der Homo-isoflavon-Rohextrakt wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie in drei Zonen aufgetrennt.

Die Laufstrecken (R_f-Werte) der einzelnen Zonen wurden auf Kieselgel- und Polyamid-Dünnschichtchromatogrammen mit denjenigen von authentischen Homo-isoflavonen verglichen und identifiziert:

Die 1. Zone (unpolar) enthielt: 4'-O-Methylpunctatin und 4'-O-Methyl-3,9-dihydro-punctatin;

die 2. Zone enthielt ausschliesslich Eucomin.

Die 3. Zone (polar) enthielt: Punctatin und 3,9-Dihydro-punctatin.

Für die Radioaktivitätsbestimmungen konnten diese Zonen nicht weiter aufgetrennt werden, da die vorhandenen Substanzmengen zu klein waren.

2.2. Homo-isoflavone aus Eucomis bicolor Bak.

Die präparative Dünnschichtchromatographie des Rohextraktes lieferte 7-O-Methyleucomin (vgl. Kap. 2.2.1.), Eucomin und Eucomol. Die Schmelzpunkte, Mischschmelzpunkte und R_f-Werte von Eucomin und Eucomol konnten mit authentischem Material verglichen werden.

Neben den bekannten Homo-isoflavonen Eucomin und Eucomol konnte bei der chromatographischen Auftrennung des Rohextraktes ein weiteres, natürliches Homo-isoflavon isoliert werden.

Das NMR.-Spektrum und die Laufstrecken auf Dünnschichtchromatogrammen waren identisch mit denen von 7-O-Methyleucomol, das von P. Böhler aus Eucomol synthetisiert worden war [1].

Im NMR.-Spektrum sind bei 3,80 ppm und 3,85 ppm die Signale der Methoxygruppe sichtbar. Das phenolische 5-Hydroxyproton ist bei 11,25 ppm sichtbar, während dasjenige der tertiären Alkoholgruppe bei 3,37 ppm auftritt.

Die charakteristischen Pragmente des Massenspektrums (m/e = 330,312,209, 181,167,121) sind im Formelschema 4 aufgezeichnet.

Wie das synthetische Vergleichspräparat, so liess sich auch das isolierte 7-O-Methyleucomol nicht kristallisieren.

3. Incorporation von Natrium-[^{14}C]-acetat

Nach den beschriebenen Methoden (Kap. III.1.) wurde unter verschiedenen Incorporationsbedingungen Natrium-[^{14}C]-acetat an jeweils zwei Zwiebeln von Eucomis punctata L'Hérit.-Pflanzen verabreicht. Ueber die isolierten Homo-isoflavone und

deren Radioaktivität orientiert Tabelle 1. Die Einbauraten sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Die bestimmten Einbauraten sind relativ gering. Dies ist u.a. darauf zurückzuführen, dass Acetat kein spezifischer "Precursor" für die Homo-isoflavone darstellt.

Bei längerer Incorporationsdauer sind die Einbauraten stets kleiner. Es scheint, dass die Homo-isoflavone im Laufe der Zeit wieder abgebaut werden. Dies ist überraschend, da diese Verbindungen an der Aussenseite der Zwiebelschalen abgeschieden werden, d.h. sich nicht mehr in Pflanzenzellen befinden. Der Erfolg der "Injektionsmethode" weist darauf hin, dass ein Stoffaustausch durch die Zwiebelschuppenwände möglich ist.

4. Incorporation [Methyl-^{14}C]-L-Methionin

Nach der "Injektionsmethode" wurde [Methyl-^{14}C]-L-Methionin an Zwiebeln von Eucomis punctata verabreicht. 14 Tage später wurden die in Tabelle 3 zusammengestellten radioaktiven Homo-isoflavone isoliert und die Einbauraten bestimmt (Tabelle 4).

Formelschema 4: Fragmentierung von 7-O-Methyleucomol

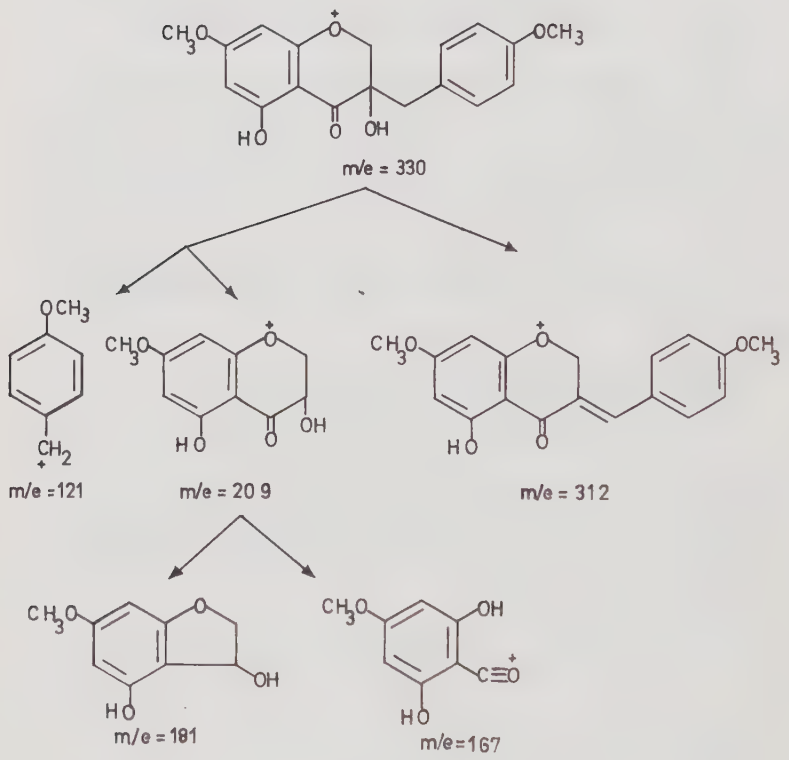


Tabelle 1: Resultate nach der Incorporation von Natrium-[1-^{14}C]-acetat in je 2 Zwiebeln von Eucomis punctata L'Hérit.

Grösse der Pflanzen		Grösse 3				Grösse 2	
Incorporationsdauer		14 Tage		24 Tage		14 Tage	
Incorporationsmethode		Injektion	Wurzel	Injektion	Wurzel	Injektion	Wurzel
4-O-Methylpunctatin + 4'-O-Methyl-3,9-dihydro-punctatin	Menge mg	8,0	13,0	22,0	22,4	11,4	24,3
	Aktivität dpm/mg	15'520	80	4'830	60	8'100	1'690
Eucomin	Menge mg	16,1	16,9	25,1	28,1	14,0	25,8
	Aktivität dpm/mg	1'200	30	320	0	3'620	1'240
Punctatin + 3,9-Dihydropunctatin	Menge mg	129,2	142,1	149,9	148,4	105,7	148,3
	Aktivität dpm/mg	3'335	10	710	0	260	250
Natrium-[1-^{14}C]-acetat ("Precursor") Aktivität bei der Incorporation	dpm/mg	$222 \cdot 10^4$	$222 \cdot 10^4$	$222 \cdot 10^4$	$222 \cdot 10^4$	$111 \cdot 10^4$	$111 \cdot 10^4$

Tabelle 2: Einbauraten [4] in % nach der Incorporation von Natrium-[1-^{14}C]-acetat in Eucomis punctata L'Hérit.

Grösse der Pflanzen	Grösse 3				Grösse 2	
Incorporationsdauer	14 Tage		24 Tage		14 Tage	24 Tage
Incorporationsmethode	Injektion	Wurzel	Injektion	Wurzel	Injektion	Wurzel
4'-O-Methylpunctatin + 4'-O-Methyl-3,9-dihydro-punctatin	$5{,}93 \cdot 10^{-2}$	$4{,}7 \cdot 10^{-4}$	$4{,}78 \cdot 10^{-2}$	$6{,}1 \cdot 10^{-4}$	$8{,}32 \cdot 10^{-2}$	$3{,}70 \cdot 10^{-2}$
Eucomin	$0{,}87 \cdot 10^{-2}$	$2{,}3 \cdot 10^{-4}$	$0{,}36 \cdot 10^{-2}$	0	$4{,}57 \cdot 10^{-2}$	$2{,}76 \cdot 10^{-2}$
Punctatin + 3,9-Dihydropunctatin	$19{,}50 \cdot 10^{-2}$	$6{,}4 \cdot 10^{-4}$	$0{,}48 \cdot 10^{-2}$	0	$2{,}48 \cdot 10^{-2}$	$3{,}34 \cdot 10^{-2}$
Total	$26{,}30 \cdot 10^{-2}$	$1{,}34 \cdot 10^{-3}$	$5{,}62 \cdot 10^{-2}$	$6{,}1 \cdot 10^{-4}$	$15{,}37 \cdot 10^{-2}$	$9{,}80 \cdot 10^{-2}$

4) Einbaurate = $\frac{\text{Gesamtaktivität im Produkt} \cdot 100}{\text{Gesamtaktivität im "Precursor"}}$ %

Tabelle 3: Resultate nach der Incorporation von $666 \cdot 10^5$ dpm [Methyl-^{14}C]-L-Methionin in je einer Zwiebel von Eucomis punctata L'Hérit.

Grösse der Pflanzen		Grösse 1	Grösse 2
4'-O-Methylpunctatin + 4'-O-Methyl-3,9-dihydro-punctatin	Menge mg	9,7	7,8
	Aktivität dpm/mg	2'033	1'552
Eucomin	Menge mg	21,1	8,7
	Aktivität dpm/mg	1'893	1'087
Punctatin + 3,9-Dihydropunctatin	Menge mg	58,3	48,0
	Aktivität dpm/mg	1'819	1'043

Tabelle 4: Einbauraten [4] in % nach der Incorporation von [Methyl-^{14}C]-L-Methionin in E. punctata L'Hérit.

Grösse der Pflanze	Grösse 2	Grösse 1
4'-P-Methylpunctatin + 4'-O-Methyl-3,9-dihydro-punctatin	$2{,}96 \cdot 10^{-2}$	$1{,}81 \cdot 10^{-2}$
Eucomin	$5{,}99 \cdot 10^{-2}$	$1{,}41 \cdot 10^{-2}$
Punctatin + 3,9-Dihydropunctatin	$15{,}92 \cdot 10^{-2}$	$7{,}51 \cdot 10^{-2}$
Total	$24{,}87 \cdot 10^{-2}$	$10{,}73 \cdot 10^{-2}$

Eucomin und Eucomol, die für den ausgearbeiteten Abbau geeignet sind, können aus Eucomis bicolor Bak. in relativ grossen Mengen isoliert werden.

Daher wurde [Methyl-^{14}C]-L-Methionin unter idealen Incorporationsbedingungen auch an 2 Zwiebeln von Eucomis bicolor Bak. verabreicht. Die Radioaktivitäten des isolierten 7-O-Methyleucomols, Eucomins und Eucomols, sowie die Einbauraten sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Radioaktivitäten und Einbauraten nach der Incorporation von [Methyl-^{14}C]-L-Methionin in zwei Zwiebeln von Eucomis bicolor Bak.

	Menge mg	Aktivität dpm/mg	Einbaurate %
7-O-Methyleucomol	17,0	7'810	$1{,}49 \cdot 10^{-2}$
Eucomin (1)	32,0	479	$1{,}73 \cdot 10^{-2}$
Eucomol (2)	77,0	764	$6{,}62 \cdot 10^{-2}$
Total			$9{,}84 \cdot 10^{-2}$

5. Diskussion

Aus den Tabellen 2 und 4 lassen sich die für die Verabreichung der "Precursors" idealen Bedingungen bestimmen:

Die Pflanzen sollten je 5 Blätter von 15 - 20 cm Länge aufweisen, d.h. 6 - 8 Wochen alt sein. Die ideale Incorporationsdauer beträgt 14 Tage. Den besten Einbau erhält man, wenn der "Precursor" nach der "Injektionsmethode" verabreicht wird.

Tabelle 5 zeigt, dass diese Incorporationsbedingungen auch für den Einbau in Eucomis bicolor Bak. geeignet sind.

Die Radioaktivität von Eucomol ist deutlich grösser als diejenige von Eucomin. Daraus lässt sich schliessen, dass bei der Biogenese dieser Verbindungen Eucomol wahrscheinlich als Vorstufe des Eucomins auftritt. Die Aktivität der Vorstufe muss nämlich grösser sein als diejenige des Produkts, welches aus ihr entsteht.

Die Versuche zeigen, dass nicht nur Essigsäure, sondern auch Methionin in die Homo-isoflavone eingebaut wird. Für die Lokalisation der Radioaktivität durch den in Kap. I.2. beschriebenen Abbau reichten die nach dem Einbau von Methionin isolierten Mengen von Homo-isoflavonen nicht. Dazu ist ein Versuch mit grösseren Zwiebelmengen erforderlich.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeines

Alle Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert: Fehlergrenze $\pm$ 2°.

Substanzproben zur Aufnahme der IR.-Spektren wurden jeweils vor der Messung 2 Std. im Hochvakuum bei 0,01 Torr und 60° getrocknet. Die Aufnahme der IR.-Spektren (fest in KBr) erfolgte mit einem Perkin-Elmer-IR-Gitterspektrophotometer, Modell 125, im Spektrallabor des Instituts für Organische Chemie (K. Aegerter). Substanzproben zur Elementaranalyse und Radioaktivitätsbestimmung wurden im Hochvakuum bei 0,01 Torr und 50° während 12 Std. getrocknet. Wir verdanken die Analysen dem mikroanalytischen Laboratorium des Instituts für Organische Chemie (E. Thommen). Die Radioaktivitätsbestimmungen wurden von Herrn Dr. F. Kalberer im Isotopenlabor der Firma Sandoz A.G., Basel, ausgeführt, wofür auch an dieser Stelle bestens gedankt sei.

Zur Säulenchromatographie diente "Kieselgel 0,05 - 0, 2 mm für die Chromatographie" der Firma E. Merck A.G., Darmstadt. Für die präparative Dünnschichtchromatographie benutzten wir "Kieselgel PF 254" (Fa. E. Merck) und für die Dünnschichtchromatographie "Kieselgel G nach Stahl" (Fa. E. Merck) unter Zusatz von Zinksilikat als Fluoreszenzindikator.

2. Synthese von 5,7-Di-O-methyleucomin (21)

2.1. 2,4-Di-O-methylphloroacetophenon (17)

Eine Lösung von 27,0 g (0,161 Mol) Phloroacetophenon (16), 32 ml (0,34 Mol) Dimethylsulfat und 225,0 g (1,63 Mol) K_2CO_3 in 1 Liter Aceton wurde unter Rühren auf dem Dampfbad erwärmt. Nach 11 Std. wurde das K_2CO_3 abfiltriert und die Acetonlösung eingedampft. Der Rückstand, der noch K_2CO_3 enthielt, wurde in Aether aufgenommen. Nach dem Eindampfen der Aetherlösung resultierten 28,5 g (90,5 % d. Th.) 2,4-Di-O-methylphloroacetophenon (17) vom Smp. 86°, Lit. 86 - 87° [19].

2.2. 5,7-Dimethoxy-2-hydroxychroman-4-on (18)

10 g geschmolzenes Natrium wurde unter Xylol in einem 500 ml Kolben geschüttelt. Nach dem Abdekantieren des Xylols wurde das Natrium mit 100 ml (1,2 Mol) Ameisensäureäthylester überdeckt. Unter Eiskühlung liess man 10 g (51 mMol) 2,4-Di-O-methylphloroacetophenon (17) gelöst in 100 ml Ameisensäureäthylester, langsam zutropfen. Nach 12 Std. wurde das Reaktionsgemisch mit Eis versetzt und mit 2N HCl auf pH=4 eingestellt. Nach kurzem Erwärmen auf 100° liess man das Gemisch auf 0° abkühlen. Nach Abfiltrieren des entstandenen Niederschlags resultierten 8,66 g (75,5 % d. Th.) Rohprodukt. Dreimaliges Umkristallisieren aus Aethanol ergab 6,32 g (55,4 % d.Th.) 5,7-Dimethoxy-2-hydroxy-chroman-4-on (18) vom Smp. 141 - 143°, Lit. 141 - 142° [20].

Zur Analyse wurde bei 50° und 0,01 Torr während 12 Std. getrocknet.

$C_{11}H_{12}O_5$ (224,2) Ber. C 58,92 H 5,40 % Gef. C 59,00 H 5,58 %

2.3. 5,7-Dimethoxychromon (19)

Eine Lösung von 17,6 g (78,5 mMol) 5,7-Dimethoxy-2-hydroxy-chroman-4-on (18) in 500 ml Aethanol, das 80 ml konz.

H_2SO_4 enthielt, wurde auf dem Dampfbad unter Rückfluss während 15,5 Std. erwärmt. Die rote Lösung wurde auf 100 ml eingeengt und nach Zugabe von 100 ml H_2O mit 500 ml Methylenchlorid extrahiert. Das nach üblichem Aufarbeiten erhaltene Rohprodukt ergab nach Umkristallisieren aus Aethanol 10 g 5,7-Dimethoxychromon (19) vom Smp. 132 - 133°, Lit. 133 - 134° [20].

Zur Analyse wurde bei 60° und 0,01 Torr während 12 Std. getrocknet.

$C_{11}H_{10}O_4$ (206,2) Ber. C 64,07 H 4,89 % Gef. C 63,66 H 4,94 %

IR.-Spektrum: u.a. Banden bei 3060, 2915, 1635, 1601, 1280, 1220, 1155, 1105, 1070, 1050, 942 und 855 cm^{-1}.

2.4. 5,7-Dimethoxychroman-4-on (20)

Eine Lösung von 2,6 g (12,61 mMol) 5,7-Dimethoxychromon (19) in 20 ml Dimethylformamid wurde mit 10-proz. Pd auf Kohle als Katalysator hydriert. Nach der Aufnahme von 1 Mol H_2 wurde vom Katalysator abfiltriert, im Vakuum eingedampft und 5,7-Dimethoxychroman-4-on (20) aus Methylenchlorid-Petroläther umkristallisiert. Smp. 99 - 100°, Lit. 100 - 101° [1].

Zur Analyse wurde bei 60° und 0,01 Torr während 12 Std. getrocknet.

$C_{11}H_{12}O_4$ (208,2) Ber. C 63,45 H 5,81 % Gef. C 63,35 H 5,84 %

IR.-Spektrum: u.a. Banden bei 2965, 1665, 1620, 1450, 1248, 1210, 1160, 1115, 975, 955, 870, 810 und 800 cm^{-1}.

2.5. 5,7-Di-O-methyleucomin (21)

Eine Lösung von 4,92 g (23,6 mMol) 5,7-Dimethylchromanon und 3,16 ml (26,0 mMol) Anisaldehyd in 40 ml Eisessig wurde

mit über H_2SO_4 getrocknetem HCl-Gas gesättigt. Nach 15 Std. wurde die dunkelrote Reaktionslösung in 80 ml Eiswasser gegossen. Die Extraktion des entstandenen roten Oels mit 600 ml Methylenchlorid lieferte nach üblichem Aufarbeiten 7,58 g (98,6 % d.Th.) Rohprodukt. Dieses wurde an 50 g Kieselgel chromatographiert; zur Elution diente Aether-Benzol-(1:1).

Umkristallisieren dünnschichtchromatographisch einheitlicher Fraktionen aus Methylenchlorid-Aether-Pentan-(1:1:1) ergab 2,6 g (34,7 % d.Th.) 5,7-Di-O-methyleucomin vom Smp. 142 - 144°, Lit. 142 - 144° [1].

Zur Analyse wurde 10 Std. bei 80° und 0,01 Torr getrocknet.

$C_{19}H_{18}O_5$ (326,3) Ber. C 70,16 H 5,66 % Gef. C 69,92 H 5,56 %

IR.-Spektrum: u.a. Banden bei 1660, 1605, 1565, 1565, 1455, 1415, 1325, 1320, 1255, 1205, 1170, 1150, 1105, 1015, 990 und 960 cm^{-1}.

3. Abbau von 5,7-Di-O-methyleucomin (21)

3.1. Isomerisierung von 5,7-Di-O-methyleucomin (21)

200 mg (0,614 mMol) 5,7-Di-O-methyleucomin (21) wurden in 200 ml abs. Aether unter Rückfluss gelöst und anschliessend während 6,5 Std. mit 3,4 ml 1 M K-t-Butoxid-Lösung in Butanol [5] unter Stickstoff auf 40° erwärmt.

Die erkaltete Lösung wurde mit 2$\underline{N}$ H_2SO_4 neutralisiert und nach der Zugabe von 180 ml Eiswasser mit 200 ml Aether extrahiert.

---

5) K-t-Butoxid in Butanol: 4 g Kalium (gereinigt) mit 100 ml abs. t-Butanol im N_2-Strom unter Rückfluss auf ca. 80° erwärmt. Titration: 2 ml K-t-Butoxid-Lösung mit 25 ml H_2O versetzt und mit 0,1$\underline{N}$ H_2SO_4 auf Phenolphtalein titriert.

Die Aetherauszüge wurden mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Die Reinigung des gelben Rohprodukts erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie (Fliessmittel: Benzol-Aether-(1:1)). Es resultierten 147,6 mg (73,7 % d.Th.) 3(2)-Anhydro-5,7-di-O-methyleucomin (24), das aus Aether-Pentan-(10:1) umkristallisiert wurde. Smp. 90 - 92°, Lit. 91 - 92° [1].

Zur Analyse wurde 15 Std. bei 50° und 0,01 Torr getrocknet.

$C_{19}H_{18}O_5$ (326,3) Ber. C 69,92 H 5,56 % Gef. C 69,66 H 5,51 %

IR.-Spektrum: u.a. Banden bei 3330, 2911, 2840, 1645, 1605, 1580, 1570, 1505, 1485, 1450, 1420, 1375, 1285, 1240, 1210, 1190 und 1160 cm^{-1}.

3.2. Abbau von 3(2)-Anhydro-5,7-di-O-methyleucomol (24)

Eine Lösung von 147 mg (0,45 mMol) 3(2)-Anhydro-5,7-di-O-methyleucomol (24) in 3 ml Aethanol wurde mit 8 ml NaOH-Lösung (5,5 g NaOH, 15 ml Aethanol, 25 ml H_2O) versetzt und während 1 Std. auf dem Dampfbad unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen war die Lösung mit Kristallen durchsetzt.

Die mit 50-proz. H_3PO_4-Lösung auf pH=4 eingestellte Lösung wurde auf 0° abgekühlt. Nach Abfiltrieren des weissen Niederschlags resultierten 123 mg (86,9 % d.Th.) 2',4',4-Tri-O-methylphloretin (26), das aus Aethanol-H_2O-(3:1) in farblosen Nadeln kristallisierte. Aufarbeiten des Filtrates siehe bei 3.3. Smp. 111 - 112°, Lit. 108° [24].

Zur Analyse wurde 3 Std. bei 40° und 0,01 Torr getrocknet.

$C_{18}H_{20}O_5$ (316,4) Ber. C 68,34 H 6,37 % Gef. C 68,18 H 6,40 %

IR.-Spektrum: u.a. Banden bei 2950, 1610, 1580, 1510, 1440, 1415, 1365, 1290, 1265, 1245, 1200, 1155 und 1115 cm^{-1}.

3.3. S-Benzylisothiuronium-formiat (25)

Das saure Filtrat aus Versuch 3.2. wurde direkt mit Wasserdampf destilliert und Fraktionen zu 100 ml aufgefangen. Die Destillate wurden mit 0,01N NaOH neutralisiert (Indikator: Phenolphtalein) und im Vakuum auf 1 ml eingeengt.

Nach Zugabe einer Lösung von 101 mg (0,5 mMol) S-Benzylisothiuronium-chlorid in 1 ml Wasser kristallisierte S-Benzylisothiuronium-formiat (25) bei 0° langsam aus. Es resultierten 22 mg (23,1 % d. Th.) Kristalle, die aus Wasser umkristallisiert wurden. Smp. 146 - 147°, Lit. 146° [17].

Zur Analyse wurde 72 Std. bei 50° und 0,01 Torr getrocknet.

$C_9H_{22}O_2N_2S$ Ber. C 50,94 H 5,70 % Gef. C 50,71 H 5,80 %
(222,4)

IR.-Spektrum: u.a. Banden bei 2940, 1700, 1575, 1495, 1425, 1370, 1350, 1250, 1170, 1120 und 815 cm^{-1}.

3.4. Methylierung von 2',4',4-Tri-O-methylphloretin (26)

Eine Lösung von 200 mg (0,63 mMol) 2',4',4-Tri-O-methylphloretin (26), 1,8 g K_2CO_3 und 0,4 ml Dimethylsulfat in 10 ml Aceton wurde während 15 Std. unter Rückfluss auf 70° erwärmt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Fliessmittel: Benzol-Methylenchlorid-(3:7)).

Die abgekühlte Lösung wurde filtriert, das Aceton abdestilliert und der Rückstand bei 0,01 Torr getrocknet. Es resultierten 203 mg (97,3 % d.Th.) hellgelbes Oel, das aus Aethanol-Wasser farblose, lange Nadeln vom Smp. 46 - 47° ergab.
Zur Analyse wurde 10 Std. bei 24° und 0,01 Torr getrocknet.

$C_{19}H_{22}O_5$ (330,4) Ber. C 69,07 H 6,71 % Gef. C 68,88 H 6,91 %

IR.-Spektrum: u.a. Banden bei 1695, 1605, 1510, 1460, 1410, 1335, 1245, 1225, 1200, 1175, 1150, 1120 und 1030 cm^{-1}.

3.5. Oxidation von 2',4',6',4-Tetra-O-methylphloretin (27)

100 mg (0,30 mMol) 2',4',6',4-Tetra-O-methylphloretin (27) wurden in 10 ml Wasser, welches 50 mg Na_2CO_3 enthielt, bei 100° suspendiert und nach Zugabe von 470 mg pulverisiertem $KMnO_4$ während 4 Std. unter Rückfluss auf 110° erwärmt.

Die abgekühlte Lösung wurde mit 2N H_2SO_4 angesäuert, das entstandene MnO_2 mit $NaHSO_3$ zuerstört und zuerst mit 100 ml Aether, dann mit 100 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt. Nach Trocknen der vereinigten Extrakte über Na_2SO_4 und Eindampfen resultierten 63,5 mg violettes Rohprodukt. Dieses lieferte nach Trennung durch präparative Dünnschichtchromatographie (Fliessmittel: Pentan-Aether-Eisessig-(75:25:1)) folgende Produkte:

1) p-Methoxybenzoesäure (28), welche im UV-Licht blau fluoreszierte und einen R_f-Wert von 0,40 aufwies, wurde mit 60 ml Aceton vom Kieselgel eluiert. Es resultierten 24,3 mg (53,3 % d.Th.) p-Methoxybenzoesäure (28), welche aus Methanol-Wasser-(1:10) in farblosen Nadeln auskristallisierte. Smp. 184 - 185°, Lit. 185° [22].

   Zur Analyse wurde 12 Std. bei 40° und 0,01 Torr getrocknet.

   $C_8H_8O_3$ (152,2) Ber. C 63,15 H 5,30 % Gef. C 63,16 H 5,53 %

   IR.-Spektrum: u.a. Banden bei 1930, 1685, 1600, 1575, 1515, 1425, 1295, 1260, 1180, 1165, 1140, 1105 und 920 cm^{-1}.

2) 2,4,6-Tetramethoxybenzoesäure (29), welche am Start verblieben war, zeigte im Dünnschichtchromatogramm (Fliessmittel: Benzol-Methanol-Eisessig-(46:8:4)) einen R_f-Wert von 0,58 und fluoreszierte im UV-Licht. Nach der Elution mit 60 ml Aceton resultierten 30,1 mg (47,4 % d.Th.) 2,4,6-Trimethoxybenzoesäure (29), die aus Methanol oder Benzol umkristallisiert wurde. Smp. 142 - 143°, Lit. 143° [23].

Zur Analyse wurde 48 Std. bei 24° und 0,01 Torr getrocknet.

$C_{10}H_{12}O_5$ (212,2) Ber. C 56,60 H 5,70 % Gef. C 56,77 H 5,70 %

IR.-Spektrum: u.a. Banden bei 2950, 1705, 1605, 1585, 1465, 1435, 1405, 1385, 1335, 1235, 1220, 1205, 1180, 1155, 1130 1050 und 1025 cm^{-1}.

4. Isolierung der bekannten Homo-isoflavone und des 7-O-Methyleucomols

Die Blätter und Wurzeln von 2 Eucomis-Pflanzen wurden abgeschnitten, die Zwiebelschalen einzeln abgetrennt und in einer Soxhlet-Apparatur mit 1,5 Liter Aether extrahiert.

Die gelbe Aetherlösung wurde auf 250 ml eingeengt, zweimal mit 70 ml Wasser gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Der Rohextrakt wurde eingedampft und durch präparative Dünnschichtchromatographie (Fliessmittel: Methylenchlorid mit 2 % Methanol) aufgetrennt. Die Elution der einzelnen Zonen erfolgte mit Methylenchlorid-Methanol-(95:5).

Aus den Extrakten von Eucomis punctata L'Hérit. wurden auf Grund der Fluoreszenz im UV-Licht drei Zonen isoliert:

R_{f1} = 0,50 : 4'-O-Methylpunctatin (4) und 4'-O-Methyl-3,9-dihydropunctatin (9)

R_{f2} = 0,30 : Eucomin (1)

R_{f3} = 0,12 : 3,9-Dihydropunctatin (8) und Punctatin (6).

Die einzelnen Zonen zeigten in den Dünnschichtchromatogrammen mit Kieselgel (Fliessmittel: Methylenchlorid mit 2 % Methanol) und mit Polyamid (Fliessmittel: Petroläther-Benzol-Methanol-Butan-2-on-(50:40:5:5)) die gleichen R_f-Werte wie das authentische Material aus Eucomis punctata L'Hérit. Auf den Dünnschichtchromatogrammen konnten die Homo-isoflavone sichtbar gemacht werden durch Besprühen mit 0,1N wässe-

riger KOH-Lösung und 0,5-proz. Echtblausalz-B-lösung in Wasser [21].

Die präparative Dünnschichtchromatographie des Rohextrakts aus Eucomis bicolor Bak. ergab ebenfalls drei Zonen:

R_{f1} = 0,27 : Eucomol (2), das aus Methylenchlorid umkristallisiert wurde. Smp. 134 - 135°.

R_{f2} = 0,40 : Eucomin (1): Umkristallisieren aus Methylenchlorid-Methanol ergab Nadeln vom Smp. 194 - 196°.

R_{f3} = 0,70 : Diese Zone enthielt 7-O-Methyleucomol.

Zur Reinigung diente noch einmal die präparative Dünnschichtchromatographie mit Kieselgel (Fliessmittel: Methylenchlorid mit 2 % Methanol) und mit Polyamid (Fliessmittel: Petroläther-Benzol-Methanol-Butan-2-on-(50:40:5:5). Es resultierten 17 mg amorphes 7-O-Methyleucomol.

NMR.-Spektrum in $CDCl_3$: u.a. Signale bei 11,25 ppm, 3,85 ppm, 3,80 ppm, 3,37 ppm.

Massenspektrum [6]: u.a. "peaks" bei 330, 312, 209, 181, 167. Vgl. Formelschema 4.

---

6) Wir danken Herrn Dr. Pascual, Physikalisch-chemisches Institut der Universität für die Aufnahme des Massenspektrums.

C. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Abklärung der Biogenese der Homo-isoflavone, insbesondere der Herkunft des zusätzlichen C-Atoms, wurde für 5,7-Di-O-methyleucomin (21) ein chemischer Abbau ausgearbeitet. Das benötigte Ausgangsmaterial wurde durch Kondensation von 5,7-Dimethoxychroman-4-on (20) mit Anisaldehyd hergestellt. Die Synthese des 5,7-Dimethoxychroman-4-ons (20) erfolgte aus Phloroacetophenon (16), das zunächst in 2,4-Di-O-methylphloroacetophenon (17) übergeführt wurde. Kondensation mit Ameisensäureäthylester ergab 5,7-Dimethoxy-2-hydroxychroman--4-on (18). Das nach der Wasserabspaltung resultierende 5,7-Dimethoxychromon (19) lieferte nach der katalytischen Hydrierung mit Pd-Kohle das gewünschte 5,7-Dimethoxychroman-4--on (20).

Der Abbau von 5,7-Di-O-methyleucomin (21) wurde wie folgt durchgeführt:

5,7-Di-O-methyleucomin (21) wurde zu 3(2)-Anhydro-5,7-Di-O--methyleucomol (24) isomerisiert. Mit NaOH liess sich das C-Atom Nr. 2 in Form von Ameisensäure abtrennen. Die Ameisensäure wurde in das kristalline S-Benzylisothiuronium-formiat (25) übergeführt. Das bei der Abspaltung der Ameisensäure entstandene 2',4',4-Tri-O-methylphloretin (26) wurde methyliert. Aus 2',4',6',4-Tetra-O-methylphloretin (27) entstand bei der Oxidation mit $KMnO_4$ p-Methoxybenzoesäure (28) und 2,4,6-Trimethoxybenzoesäure (29).

Mit Hilfe dieses Abbaus ist es möglich, die biogenetisch interessanten C-Atome Nr. 2, 4 und 9 des Homo-isoflavons voneinander abzutrennen.

Nach Verabreichung von radioaktivem Natrium-[1-^{14}C]-Acetat und [Methyl-^{14}C]-Methionin an Eucomis-Pflanzen wur-

Resultate zeigen, dass Essigsäure und auch Methionin in die Homo-isoflavone eingebaut werden. Um die Bedingungen für einen optimalen Einbau dieser "Precursors" zu finden, wurden mehrere dieser Versuche unter verschiedenen Incorporations- und Wachstumsbedingungen mit Eucomis-Pflanzen durchgeführt.

Im Verlaufe dieser Versuche konnte aus Eucomis bicolor Bak. 7-O-Methyleucomol isoliert werden. Dieser Naturstoff war identisch mit 7-O-Methyleucomol, welches synthetisch aus Eucomol (2) hergestellt worden war.

D. LITERATURVERZEICHNIS

[1] W. T. Thiselton-Dyer, Flora Capensis, Vol. VI, 475 (1896-97).

[2] a) P. Böhler, Diss. Univ. Basel, 1967.

b) P. Böhler & Ch. Tamm, Tetrahedron Letters 1967, 3479.

[3] W. T. L. Sidwell & Ch. Tamm, Tetrahedron Letters 1970, 475.

[4] R. E. Fibckh & Ch. Tamm, Exper. 26, 472 (1970).

[5] A. Hutchinson, D.C. Taper & G. H. N. Towers, Canad. J. Biochem. Physiol. 37, 901 (1959).

[6] E. W. Underhill, J. E. Watkin & A C. Neish, Canad. J. Biochem. Physiol. 35, 219, 229 (1957).

[7] D. R. McCalla & A. C. Neish, Canad. J. Biochem. Physiol. 37, 531 (1959).

[8] H. Grisebach & L. Patschke, Chem. Ber. 93, 2326 (1960).

[9] H. Grisebach & W. D. Ollis, Exper. 17, 4 (1961).

[10] L. Crombie, C. L. Green & D. A. Whiting, Chem. Comm. 1968, 234.

[11] a) D. H. R. Barton, G. W. Kirby, J. B. Taylor, Proc. Chem. Soc. 1962, 340;

b) A. R. Battersby, R. J. Francis, M. Hirst, R. Southgate & J. Staunton, Chem. Comm. 1967 602.

c) A. R. Battersby, Proc. Chem. Soc. 1963, 189.

[12] A. C. Waiss, Jr. & J. Corse, J. Amer.Chem. Soc. 87, 2068 (1965).

[13] A. Sutter & H. Grisebach, Phytochemistry 8, 101 (1969).

[14] R. B. Woodward, Angew. Chem. 68, 13 (1956).

[15] P. Pfeifer, E. Breith & H. Hoyer, J. Prakt. Chem. 237, 31 (1931)

[16] O. Dann & H. Hoffmann, Chem. Ber. 98, 1498 (1965).

[17] J. Donleavy, J. Amer. Chem. Soc. 58, 1004 (1936).

[18] T. Kubota & T. Matsuura, J. Inst. Polytechnics, Osaka City Univ., Vol. 1, No. 2, Serie C, 49 (1950).

[19] H. F. Dean & M. Nierenstein, J. Amer. Chem. Soc. 47, 1679 (1925).

[20] N. Narisimhachari, D. Rajagopalan & T. R. Seshadri, J. Sci. Industr. Res. Vol. 12B, 287 (1953).

[21] E. Stahl, Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl. Springer-Verlag, Berlin (1967).

[22] G. B. Frankforter, J. Amer. Chem. Soc. 48, 3144 (1926).

[23] T. R. Govindachari, K. Nagarajan & B. R. Pai, J. Chem. Soc. 1956, 629.

[24] F. Wessely & K. Sturm, Monatshefte 53, 54, 554 (1929).

E. CURRICULUM VITAE

Am 8. April 1944 wurde ich, Paul Andermatt, in Basel als zweiter Sohn des Richard Andermatt, Gärtnermeister von Merenschwand AG., und seiner Frau Frieda, geb.Gutknecht, geboren. Von 1951 bis 1956 besuchte ich die Primarschule in Ettingen BL. Nach dem Besuch der Realschule in Therwil von 1956 bis 1958 trat ich ins Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gymnasium in Basel ein.

Im Frühjahr 1964 bestand ich die Matura und begann anschliessend mit dem Chemiestudium an der Universität Basel. Im Herbst 1965 bestand ich das 1. Vordiplomexamen, das zweite legte ich - mit dem Wahlfach Botanik - im Herbst 1966 ab. Das Diplom für Chemie erwarb ich im Frühjahr 1968. Anschliessend begann ich die vorliegende Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ch. Tamm.

Im Jahre 1968 unterrichtete ich Chemie am Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Gymnasium, Basel; anschliessend war ich während drei Semestern Praktikumsassistent am Organischen Institut.

Während zwei Wintersemestern besuchte ich die pädagogischen Kurse am Kantonalen Lehrerseminar Basel, wo ich im Frühjahr 1971 das Oberlehrerdiplom erhielt.

Während 1 1/2 Jahren hat mir die Schweizerische Gesellschaft für Chemische Industrie ein Doktorandenstipendium gewährt, wofür ich ihr herzlich danke.

Folgenden Herren Professoren und Dozenten verdanke ich meine Ausbildung:

H. Balli, M. Brenner, P. Buchner, P. Diehl, H. Erlenmeyer, S. Fallab, J. Gantner, M. Geiger-Huber, C. Grob, P. Hemmerich, P. Huber, A. Marxer, B. Prijs, W. Rathfelder, T. Reichstein, H. Reinhadt, E. Salin, H. Salmony, P. Schiess, M. Staehelin, Ch. Tamm, M. Thürkauf, R. Wizinger, R. Zürcher.